

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**SISTEMA PURINÉRGICO EM LINHAGEM T24 DE TUMOR DE BEXIGA:  
IDENTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES E CARACTERIZAÇÃO DAS  
ECTO-NUCLEOTIDASES**

**JOSÉLI STELLA**

**Orientadora**

**DRA. ANA MARIA O. BATTASTINI**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**Porto Alegre**

**2006**

*“É na experiência da vida que o homem evolui”*

*Harvey Spencer*

*À minha família,  
pelo constante apoio.*

## ***AGRADECIMENTOS***

À Ana, pela orientação, pela oportunidade de crescimento pessoal, científico e profissional, pelos anos de convivência, atenção, paciência e amizade, pelo exemplo de profissional.

À Fernanda, acima de tudo pela amizade, por toda ajuda e orientação ao longo dos anos, pela paciência, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e crescer, sempre mostrando caminhos, pelo constante estímulo em prosseguir e nunca desistir.

Ao Professor Sarkis, pela ótima convivência, por toda atenção, cordialidade, amizade e ajuda.

Ao Departamento de Bioquímica, seus professores e funcionários, em especial a Cléia pela competência, sempre prestativa e atenciosa.

Aos colegas do Departamento que de alguma forma me auxiliaram, pela colaboração, ajuda, amizade e coleguismo.

À Dona Lia, pelo apoio técnico e colaboração indispensável para quem trabalha com cultura.

Aos colegas da Sala de Cultura pelo convívio harmonioso, pelas conversas, por compartilhar angústias e pelas ajudas, em especial a Cláudia e a Fernanda.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia por todos momentos já compartilhados ao longo desses anos de convívio, festinhas, pela amizade, por todos os ensinamentos, ajudas, apoio, exemplos de profissionais e amigos.

As amigas que conheci no laboratório e que serão para sempre: Ba, Cris, Dani P., Eliz, Japa, Lilá, Lú, Paula, Sandra, Vá, Vanessinha.

À Eliz, por toda ajuda na parte de biologia molecular, e pela excelente colaboração em tudo.

À Luci, presente em todos os momentos, pela ajuda, companhia e auxílio em todos os experimentos, pelo estímulo, paciência, colaboração, competência e amizade desde o início.

Aos meus pais, Milton e Lídia, pelo amor incondicional, atenção, ensinamentos e pelo exemplo de vida, honestidade, trabalho, por me ensinarem o valor de estudar, por sempre estarem ao meu lado, apoiando e estimulando ao constante crescimento pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Diogo e Milton, pelo amor, atenção, ajuda, pelos incansáveis conselhos e pelo constante apoio. A minha cunhada Lú, por sempre me estimular a perseguir e conquistar meus objetivos, pelas ajudas e conselhos. À Laura, minha afilhada que nos últimos anos tornou minha vida mais alegre e significativa.

Ao Gabriel, meu amor, pelos momentos vividos, pelo apoio, carinho, paciência e torcida. Por ser um ótimo namorado e companheiro.

As queridas amigas que conquistei na vida, pela amizade, pelos momentos já compartilhados que foram e são fundamentais para tornar a vida especial, sempre torcendo, apoiando e entusiasmando: Aline, Cris, Carol, Elisa, Juli, Lú, Lilá, Paty, Vá, Vane, Marina, Jane.

À Família Célio Stella, minha segunda casa, pelo carinho, apoio e torcida em todos os momentos.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação.

A CAPES, FAPERGS, PROPESQ/ UFRGS.

## **RESUMO**

Tumor de bexiga é o tipo de tumor mais comum que ocorre no trato urinário, originado a partir do epitélio estratificado da bexiga. A incidência em homens é maior do que em mulheres, está associado com a industrialização e relacionado com a origem ocupacional do paciente. Mais de 90% dos tumores de bexiga são devidos a alterações neste epitélio, sendo o principal tipo, o tumor nas células transicionais. A linhagem T24 de tumor de bexiga humana tem sido usada como modelo de tumor invasivo de bexiga. Nucleotídeos são uma importante classe de moléculas sinalizadoras, conhecidos por regular muitas funções pato-fisiológicas no espaço extracelular. O ATP extracelular é conhecido por mediar uma variedade de respostas biológicas no sistema nervoso central e periférico, principalmente pela ligação aos receptores acoplados à proteína G, P2Y ou pelos receptores ligados aos canais iônicos, P2X. A sinalização mediada pelos nucleotídeos é controlada por uma eficiente cascata enzimática que inclui os membros das ecto-nucleotidases E-NTPDases, E-NPPs e ecto-fosfatases alcalinas as quais de formas diferenciadas podem gerar AMP que pode ser hidrolisado pela ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT, CD73) gerando adenosina. Muitos estudos têm indicado que o ATP extracelular exerce um efeito primordial no trato urinário e que suas ações são mediadas por receptores P2. Baseado na ampla distribuição das ecto-nucleotidases em vários tipos de tecidos e considerando a potencial participação destas enzimas na regulação da sinalização purinérgica em tecido de bexiga normal e tumoral, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das ecto-enzimas e a presença dos receptores purinérgicos nas células T24 de tumor de bexiga humano. Muitos estudos vêm demonstrando evidências da relação entre o sistema purinérgico e o crescimento tumoral. Nossos resultados mostraram que as células T24 apresentam uma extrema diminuição da capacidade de hidrólise dos nucleotídeos tri- e difosfatados quando comparada com os nucleotídeos monofosfatados, que apresentam uma alta capacidade de hidrólise. Os resultados obtidos pela hidrólise mostram uma baixa expressão das E-NTPDases, contrastando com uma significativa atividade da ecto-5'-nucleotidase, e pelo menos um membro da família das E-NPPs. Muitos papéis fisiológicos para a família das E-NPPs têm sido descritos incluindo reciclagem de nucleotídeos e modulação da sinalização purinérgica. No presente estudo nós analisamos a atividade desta enzima na linhagem celular T24 em pH ótimo para as E-NPPs e em pH fisiológico para cultura de células. Curvas de tempo e substrato mostraram atividade das E-NPPs apenas no pH ótimo da enzima. A análise por RT-PCR mostrou a presença apenas da E-NPP1. Quanto à expressão das ecto-enzimas, nosso estudo mostrou que a linhagem T24 expressa apenas a E-NTPDase 5 (CD39L4) e não expressa as demais E-NTPDases. Nós identificamos todos os receptores P2Y nas células, dando suporte a idéia de que alterações no número de células tumorais pode ser devido a modulação da proliferação celular via receptores P2. Em nosso estudo também investigamos o efeito do ATP extracelular nas células T24, em diferentes concentrações e tempos de tratamento, mostrando que o ATP extracelular diminui significativamente o número de células. Estes dados indicam que as vias de sinalização purinérgica podem ter um importante papel na regulação das funções da bexiga urinária. Outros estudos são necessários para confirmar as funções do sistema purinérgico nos tumores de bexiga e as possíveis terapias antitumorais.

## ***ABSTRACT***

Bladder cancer is the most commonly tumor occurring in urinary tract, originating from normal stratified transitional epithelium of the bladder. The incidence in men is bigger than in women and is associated with industrialization and related to occupational origin. More than 90% of histological cell type of bladder cancer is transitional cell carcinoma. The T24 cell is a lineage of human bladder transitional cell carcinoma, and it has been used as model of invasive bladder cancer. Nucleotides, an important class of signaling molecules, are known to regulate many pathophysiological functions in the extracellular space. Extracellular ATP is recognized as an agonist that mediates a wide variety of biological responses in the central and peripheral nervous systems, largely by binding to either G protein-coupled receptors P2Y or ligand-gated P2X receptors. The nucleotide-mediated signaling is controlled by a highly efficient enzymatic cascade which includes the members of E-NTPDase (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase) family, E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) family and ecto-alkaline phosphatases. The AMP formed by the action of these enzymes is hydrolyzed to adenosine by the action of an ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT, CD73). Although several lines of evidence have indicated that extracellular ATP plays primordial role in the urinary tract and these actions are mediated by P2 receptors. Based on the wide distribution of ecto-nucleotidases in various tissues and considering the potential participation of these enzymes in the regulation of purinergic signaling in normal and tumoral bladder tissues, the objective of the present study was to examine the activity of ecto-enzymes and the presence of the purinergic receptors in T24 human bladder tumor cell line. Several studies have demonstrated evidence for the relation between the purinergic signaling and tumor growth. Our results show that T24 cell line presents an extremely decreased capacity to hydrolyze all tri- and di-phosphate nucleosides when compared to the nucleoside monophosphates, which have a higher capacity to hydrolyze. The results obtained show a low expression of E-NTPDases, contrasting to a significant activity of ecto-5'-nucleotidase, and at least one of the enzymes family of E-NPPs. Multiple physiological roles for E-NPPs have been related, including nucleotide recycling and modulation of purinergic receptor signaling. In the present study, we describe an enzyme activity in T24 cell line in the optimum pH for E-NPP and in physiological pH to the culture cells. Time and substrate curve have shown an E-NPP activity only in the enzyme optimal pH. The RT-PCR analysis showed the presence of only the E-NPP1. Regarding the expression of the ecto-enzymes, our study has showed that the T24 cell line expresses only the E-NTPDase 5 (CD39L4) and does not express the other E-NTPDases. We have identified all P2Y receptors in the cell line studied supporting the idea that the alteration of cancer cell number might be due to modulation of cell proliferation via P2 receptors. In this study we also investigated the effects of extracellular ATP in T24 cell line in different concentrations and times of treatment. As shown, the extracellular ATP decreases significantly the cell number. These data could indicate that the purinergic signaling pathways may play an important role in regulating urinary bladder function. Further studies to provide functions for the purinergic system in bladder tumor will be necessary to improve the possibilities of antitumor therapies.

## **SUMÁRIO**

### **1 INTRODUÇÃO**

<b>1.1 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 ECTO-NUCLEOTIDASES.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 ECTO-NUCLEOTIDASES E TUMORES.....</b>	<b>11</b>

### **2 OBJETIVOS.....15**

### **3 CAPÍTULO 1.....16**

<b>3.1 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>17</b>
-----------------------------------	-----------

### **4 DISCUSSÃO.....43**

#### **4.1 ECTO-NUCLEOTIDASES EXPRESSAS EM LINHAGEM DE TUMOR**

<b>TRANSICIONAL DE BEXIGA.....</b>	<b>43</b>
------------------------------------	-----------

<b>4.2 A EXPRESSÃO DA 5'-NUCLEOTIDASE NO TUMOR DE BEXIGA.....</b>	<b>46</b>
---	-----------

#### **4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EM LINHAGEM**

<b>DE TUMOR DE BEXIGA HUMANO.....</b>	<b>47</b>
---------------------------------------	-----------

<b>4.4 EFEITO DO ATP EXTRACELULAR NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS T24.....</b>	<b>49</b>
--	-----------

### **5 CONCLUSÃO.....52**

### **6 PERSPECTIVAS.....53**

### **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....54**



## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

ADP – adenosina difosfato  
AMP – adenosina monofosfato  
ATP – adenosina trifosfato  
 $\beta$ -GLI –  $\beta$ -glicerofosfato  
CTP – citidina trifosfato  
(E-) NPP – (Ecto-) nucleotídeo pirofosfato/fosfodiesterase  
(E-) NTPDase – (Ecto-) nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase  
Ecto-ADA- ecto-adenosina deaminase  
Ecto-5'-NT/ CD73- ecto 5'-nucleotidase/CD73  
GLI-6-P – Glicose 6-fosfato  
GPI – glicosilfosfatil inositol  
GTP- guanosina trifosfato  
mRNA – RNA mensageiro  
NTP- nucleosídeo trifosfato  
NDP- nucleosídeo difosfato  
Pi – fosfato inorgânico  
*p*-Nph-5'-TMP – *p*-nitrofenil-5'-timidina monofosfato éster  
TCA – ácido tricloroacético  
PPi – Pirofosfato inorgânico  
P1- receptor purinérgico metabotrópico para adenosina, dividido em quatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> e A<sub>3</sub>.  
P2X- receptor purinérgico ionotrópico  
P2Y- receptor purinérgico metabotrópico  
p53- gene supressor tumoral  
Ras- proteína G monomérica, envolvido no controle do crescimento celular.  
RT-PCR- transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase  
SNC – sistema nervoso central  
TCC- tumor de células transicionais  
UDP- uridina difosfato  
UTP- uridina trifosfato

## 1 INTRODUÇÃO

Tumor de bexiga é um dos tipos de cânceres mais comuns no mundo, com alta incidência em países desenvolvidos, sendo um dos primeiros tipos de câncer associados à industrialização tendo aumento da ocorrência no mundo moderno (Wallace, 1988). Nos EUA, segundo o Instituto Nacional do Câncer, estão previstos para o ano de 2006, 61.420 novos casos de tumor de bexiga e 13.060 óbitos causados por esse tipo de tumor. O câncer de bexiga é a quarta maior incidência entre os homens e a sétima entre as mulheres nos EUA (Cancer Statistics, 2005). Alguns fatores de risco estão associados ao aparecimento deste tipo de tumor, como tabaco, idade e o tipo de trabalho. O fumo é indicado como o principal fator de risco para o desenvolvimento de um tumor de bexiga, estima-se que esteja relacionado com 60% dos casos. Trabalhadores de indústria de borracha, produtos químicos, produtos de couro, metalúrgicos, maquinistas, pintores, área têxtil, camioneiros e cabeleireiros parecem ter o risco aumentado devido à presença de produtos carcinógenos no local de trabalho.

O urotélio é a camada de células transicionais que reveste internamente o sistema urinário (Lamm e Torti, 1996). Mais de 90% dos tumores de bexiga são devidos a alterações neste epitélio, sendo o principal tipo, o tumor nas células transicionais (TCC) (Piazza *et al.*, 2001). O estágio clínico do carcinoma de bexiga é determinado pelo grau de invasão do tumor, comprometimento de nódulos linfáticos e presença de metástase.

Segundo a classificação TNM abaixo descrita, os tumores de bexiga são classificados após análise do tamanho do tumor, linfonodos comprometidos e presença de metástase, nos seguintes graus:

### Tumor Primário (T)

- TX: Tumor primário não pode ser avaliado
- TO: Sem evidência de tumor primário
- Ta: Carcinoma papilar não invasivo
- Tis: Carcinoma *in situ*
- T1: Tumor que invade tecido conectivo subepitelial
- T2: Tumor que invade músculo
  - PT2a: Tumor que invade músculo superficial
  - PT2b: Tumor que invade músculo profundo
- T3: Tumor que invade tecido perivesical
  - pT3a: Microscopicamente
  - pT3b: Macroscopicamente
- T4: Tumor que invade: próstata, útero, vagina, parede pélvica e parede abdominal
  - T4a: Tumor que invade próstata, útero, vagina
  - T4b: Tumor que invade parede pélvica, parede abdominal

### Nódulos Linfáticos Regionais (N)

- NX: Nódulos linfáticos não podem ser avaliados
- NO: Sem metástase nos nódulos linfáticos regionais
- N1: Metástase em um único nódulo linfático, com dimensão  $\leq 2\text{cm}$
- N2: Metástase em um único nódulo linfático com dimensão  $> 2\text{cm}$ , mas  $\leq 5\text{cm}$  ou nódulos com dimensão  $> 5\text{cm}$
- N3: Metástase em nódulo linfático com dimensão  $> 5\text{cm}$

## Metástases Distantes (M)

- MX: Metástase distante não pode ser avaliado
- MO: Sem metástase distante
- M1: Com metástase distante

A linhagem T24 de tumor de bexiga humana, estudada nesta dissertação, é derivada de um tumor de grau 3 (T3, tumor que invade tecido perivesical, segundo a classificação TNM), pouco diferenciada e com alta invasividade, sendo, por isso, usada como modelo de tumor invasivo de bexiga (Ashfaque *et al.*, 2005).

Pesquisas para identificar defeitos moleculares específicos para a tumorigênese da bexiga têm identificado mutações em genes como RAS e p53, ou alterações na expressão de proteínas, que são conhecidas por regular a progressão do ciclo celular e/ou apoptose (Piazza *et al.*, 2001). Também pode haver relação com a expressão dos proto-oncogenes e oncogenes relacionados a receptores de fatores de crescimento epidermal (Lamm e Torti, 1996). Além disso, análise da expressão diferencial de proteínas durante a progressão de câncer de bexiga em humanos, bem como o potencial papel da glicosilação de proteínas e sua possível interação com a matriz extracelular, têm sido relacionados com a invasividade desses tumores (Pryzbylo *et al.*, 2002; Ashfaque *et al.*, 2005; Dozmorov *et al.*, 2006).

### ***1.1 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA***

As purinas e pirimidinas extracelulares são moléculas sinalizadoras que apresentam diversos efeitos sobre muitos processos biológicos, incluindo neurotransmissão, contração de músculo liso, secreção, resposta imunológica, inflamação, agregação plaquetária, dor, modulação da função cardíaca entre outros (Ralevic e Burnstock, 1998). Além dos diversos

efeitos fisiológicos do ATP já bem estudados, evidências mostram que o ATP extracelular pode: estimular a mitogênese e proliferação celular (Lemmens *et al.*, 1996), estimular a síntese de DNA "in vivo" e causar efeitos citostáticos e citotóxicos em algumas células de tumor (Dombrowski *et al.*, 1993).

A adenosina por sua vez, exerce importantes funções citoprotetoras incluindo estímulo à angiogênese e inibição das reações inflamatórias nos locais de injúria (Spychalla, 2000). Devido a estas propriedades, a adenosina pode também exercer um amplo benefício para as células tumorais. Durante o rápido crescimento, os tumores sólidos experimentam severa hipóxia e necrose, as quais causam degradação de nucleotídeos da adenina e liberação de adenosina. A adenosina desta forma gerada pode então, oferecer um ambiente protetor contra a isquemia, estimular o crescimento, angiogênese e supressão da resposta imune (Spychalla, 2000).

Estas moléculas sinalizadoras medeiam seus efeitos por interações com diferentes receptores de superfície celular denominados purinoreceptores os quais tem diferentes sensibilidades ao ATP, ADP e Adenosina. Existem duas principais famílias de purinoreceptores, os receptores de adenosina ou do tipo P1, e os receptores do tipo P2, que reconhecem principalmente o ATP e o UTP e seus análogos difosfatados (Ralevic e Burnstock, 1998). Os receptores P1 preferencialmente reconhecem a adenosina e são identificados quatro subtipos acoplados à proteína G: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, esse receptores são classificados desta forma com base em evidências moleculares, bioquímicas e farmacológicas (Fredholm *et al.*, 1997).

Seguindo critérios farmacológicos, os receptores P2 são divididos em dois grupos distintos: ionotrópicos ou ligados a um canal iônico (P2X) e metabotrópicos ou acoplados à proteína G (P2Y). Sete membros da família dos receptores ionotrópicos já foram clonados e

identificados (P2X<sub>1</sub> – P2X<sub>7</sub>), sendo que o receptor funcional é formado por três subunidades, possibilitando assim a formação de receptores heteroméricos. Considerando que muitos destes receptores são expressos na mesma célula, potencialmente a ação dos mesmos pode produzir um grande número de respostas com características farmacológicas e funcionais diferenciadas (Ralevic e Burnstock, 1998).

A maioria dos receptores P2X está distribuída distintamente nos neurônios centrais e periféricos. Entre eles a expressão de P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>3</sub>, está restrita à subpopulação de neurônios sensoriais. O ATP liberado em virtude da lesão tecidual pode evocar a sensação de dor mediada por purinoreceptores P2X<sub>3</sub>, particularmente na uretra, bexiga e intestino (Burnstock, 2001). O ATP é liberado durante a distensão das células epiteliais da bexiga e dos tubos, como a uretra e o intestino, atuando em receptores P2X<sub>3</sub> em um plexo nervoso subepitelial para iniciar impulsos que são retransmitidos via cordão espinal aos centros da dor no cérebro (Burnstock, 2001). O reflexo de micturação pode ser iniciado pela contração ou distensão das células detrusoras do músculo liso, ou pela sinalização a partir do urotélio. Como citado no parágrafo anterior, tem sido mostrado que a distensão da bexiga é causada pela liberação de ATP a partir do urotélio, o qual pode ativar receptores P2X<sub>3</sub> nos terminais nervosos aferentes suburotelial para evocar a descarga neural. Muito provavelmente a ativação das fibras aferentes durante a distensão da bexiga envolve não somente ATP, mas outros transmissores inibitórios e estimulatórios. Estes mecanismos podem ser alvo para o desenvolvimento de drogas com potencial ação nas disfunções do sistema urinário (Andersson, 2002).

Até o momento foram identificados nove membros da família dos receptores metabotrópicos em células humanas (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>, P2Y<sub>15</sub>). Esses receptores são ativados tanto por purinas como por pirimidinas, e são

destinguidos farmacologicamente pela ordem de efetividade dos agonistas, ou seja, pela sua preferência por pirimidinas ou purinas (Ralevic e Burnstock, 1998; White e Burnstock, 2006). A expressão dos receptores P2Y tem sido estudada em diversos tipos celulares. Estudos com agonistas e antagonistas sugerem que o receptor P2Y<sub>1</sub> medeia a diminuição do número de células, enquanto que os receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>12</sub> estariam envolvidos com a proliferação celular. Essa ambigüidade de efeitos pode ser devida à ativação simultânea de diferentes segundos mensageiros, com efeitos opostos em relação ao número de células, ou também pelas diferentes concentrações de ATP necessárias para causar a resposta (White e Burnstock, 2006).

## ***1.2 ECTO-NUCLEOTIDASES***

O ATP extracelular, bem como os demais nucleotídeos púricos e pirimídicos, podem ser rapidamente metabolizados pela ação das ecto-nucleotidases as quais exercem um importante papel na regulação das respostas mediadas pelos purinoreceptores. Assim, a desfosforilação seqüencial e completa do ATP produzindo adenosina ocorre pela ação conjunta das ecto-nucleotidases (E-NTPDases, E-NPPs e ecto-fosfatases alcalinas) as quais, de formas diferenciadas, podem gerar AMP que pode ser hidrolisado pela ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT, CD73) gerando adenosina. A adenosina assim formada pode por sua vez, exercer importantes efeitos em diferentes sistemas biológicos podendo também estar envolvida nos processos de diferenciação e proliferação celular (Lemmens *et al.*, 1996).

As ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDases) envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos têm sido ampla e profundamente estudadas nos últimos anos. Em mamíferos até o momento, foram clonados e caracterizados oito

membros da família das E-NTPDases: NTPDase 1 (CD39), NTPDase 2 (CD39L1), NTPDase 3 (CD39L3, HB6), NTPDase 4 (UDPase, LALP70), NTPDase 5 (CD39L4, ER-UDPase, PCPH) , NTPDase 6 (CD39L2), NTPDase 7 e NTPDase 8 (Bigonnesse et al., 2004).

Essa família de genes também tem membros em invertebrados, plantas, fungos e protozoários. As enzimas em mamíferos hidrolisam nucleosídeos di e trifosfatados, com diferenças consideráveis na preferência pelos substratos. Os sítios catalíticos estão voltados para o meio extracelular ou para o lúmen das organelas intracelulares como Golgi e retículo endoplasmático. Os membros individuais, podem diferir na seqüência de aminoácidos, porém todos compartilham as cinco regiões conservadas, sendo essa uma marca característica dessa família (Zimmermann, 2001).

Enquanto todos os membros da família catalisam a hidrólise de ambos nucleosídeos trifosfatados (NTP) e nucleosídeos difosfatos (NDP), as razões de hidrólise (NTP: NDP), variam significativamente para essas reações, resultando em enzimas que hidrolisam preferencialmente NTPs (NTPDase 2), preferencialmente NDPs (NTPDase 5 e 6) ou ambos nucleotídeos (NTPDase 1 e 3) (Zimmermann, 2001; Grinthal e Guidotti, 2002).

A NTPDase 1 que apresenta a mesma preferência pela hidrólise do ATP e do ADP, tem sido a mais estudada dos membros da família das E-NTPDases. A característica que mais distingue a NTPDase 2 dos outros dois membros relacionados, NTPDase 1 e NTPDase 3, é a sua clara preferência pelos nucleosídeos trifosfatados. Essa característica pode ser importante em situações patológicas e injúrias onde as células sejam expostas a elevados níveis de ATP extracelular (Mateo *et al.*, 1999).

A NTPDase 3 (CD39L3, HB6) é considerada um intermediário funcional entre a NTPDase 1 e NTPDase 2 por hidrolisar o ATP e o ADP numa razão de 3:1. Tem sido



descrito que a enzima hidrolisa eficientemente os nucleosídeos tri-fosfatados, mas mais lentamente difosfatados, representando assim, uma forma diferenciada de controle do tempo de permanência dos nucleotídeos no meio extracelular (Zimmermann, 2001).

A NTPDase 4 compartilha a estrutura geral das NTPDases 1, 2 e 3, porém revela uma localização intracelular. As duas formas humanas mais relacionadas estão alocadas no aparato de Golgi (NTPDase 4 $\beta$ ) (Wang e Guidotti, 1998) e nos vacúolos lisossômicos (NTPDase 4 $\alpha$ , LALP70) (Biederbick *et al.*, 1999).

Até o presente momento existem poucos trabalhos na literatura, descrevendo a NTPDase 5 ou CD39L4 (Mulero *et al.*, 1999 e 2000). Mulero e colaboradores (1999) mostraram pela primeira vez que a CD39L4 é secretada de células de mamíferos. A NTPDase 6 (CD39L2), apresenta muitas similaridades com a CD39L4, tanto estruturais quanto funcionais. Como descrito para NTPDase 5 (CD39L4), a NTPDase 6 (CD39L2) também é descrita como uma proteína ligada à membrana e potencialmente solúvel. Acredita-se que a sinalização de clivagem esteja no N-terminal do único domínio transmembrana, possibilitando a liberação da enzima da membrana via proteólise (Mulero *et al.*, 2000). Muito recentemente duas novas enzimas da família foram clonadas, as NTPDases 7 e 8. A NTPDase 7 prefere nucleosídeos trifosfatos e está localizada em vesículas intracelulares e a NTPDase 8 prefere o ATP ao ADP, numa relação de cerca de 2:1 (Lavoie *et al.*, 2004).

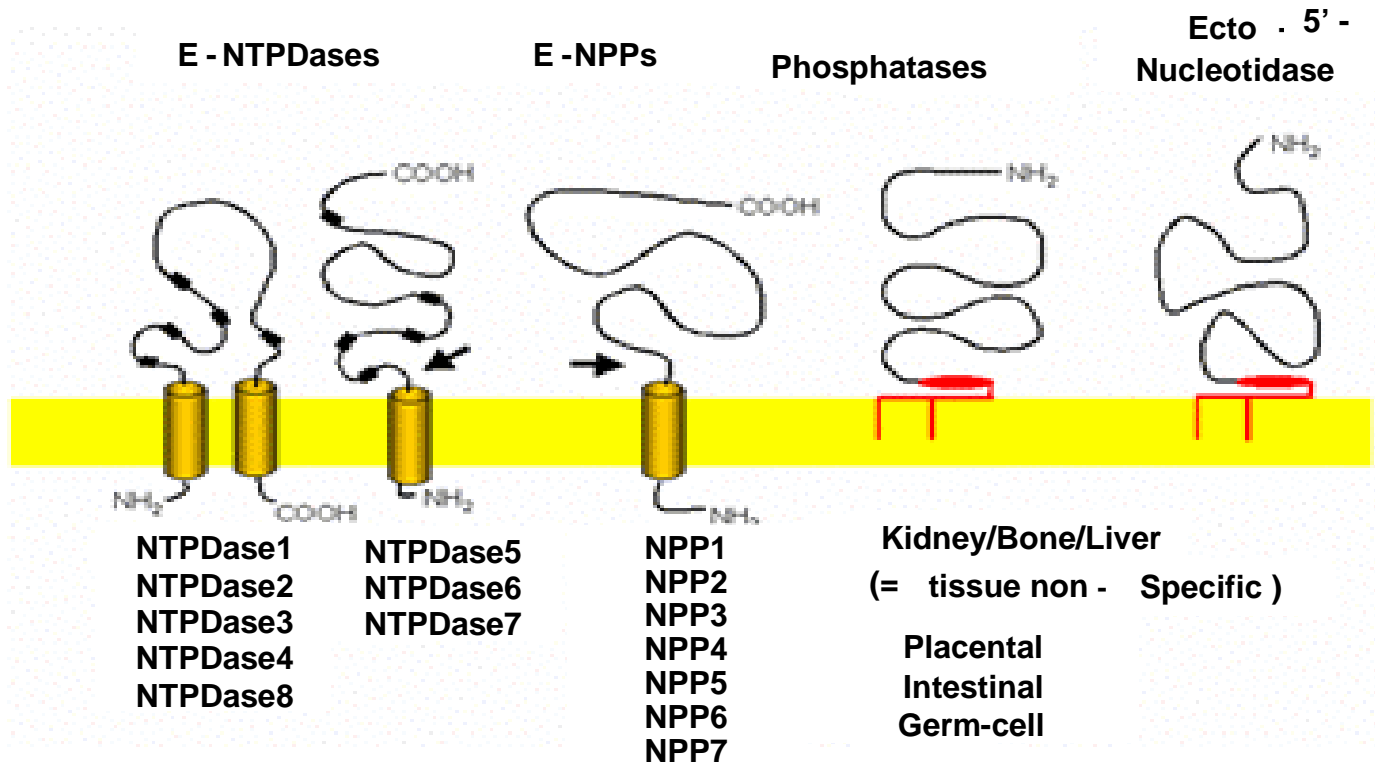
Além destas enzimas o ATP extracelular pode ser hidrolisado por ação das ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase, também denominadas E-NPPs. Esta família consiste de sete ecto-enzimas relacionadas (Stefan *et al.*, 2005). Estas enzimas também possuem uma ampla distribuição tecidual e incluem os antígenos de diferenciação celular NPP1, NPP2 (PD-I $\alpha$ , autotaxina) e NPP3 (PD-I $\beta$ , B10, gp130RB13-6). Todos os membros

são ligados à membrana por um único domínio transmembrana N-terminal e apresentam um domínio para clivagem proteolítica, sugerindo que possam ocorrer como enzimas solúveis (Zimmermann 1999, 2001). Muitos papéis fisiológicos para a família das E-NPPs têm sido descritos: mineralização óssea, digestão, proliferação e motilidade celular, reciclagem de nucleotídeos e modulação da sinalização purinérgica (Bollen *et al.*, 2000; Goding *et al.*, 2003). A expressão anormal das NPPs pode estar envolvida na mineralização patológica, deposição de cristais nas articulações, invasão e metástase de células de câncer, angiogênese e diabetes tipo II (Goding *et al.*, 2003).

As fosfatases alcalinas possuem uma ampla especificidade por substratos, degradando não somente os nucleotídeos 5'-tri-, -di e -monofosfatos, mas também liberando fosfato inorgânico a partir de uma variedade de compostos orgânicos, incluindo proteínas. Similar à ecto-5'-nucleotidase, a fosfatase alcalina está ancorada na membrana plasmática via glicosilfosfatidil inositol (GPI) (Zimmermann, 2001).

A ecto-5'-nucleotidase (CD73, ecto-5'-NT) também participa do metabolismo dos nucleotídeos da adenina, atuando em conjunto com as E-NTPDases e/ou E-NPPs. Esta proteína é um homodímero ligado à membrana plasmática através de uma âncora lipídica de GPI, seu sítio catalítico é voltado para o meio extracelular, a atividade hidrolítica é potencializada por cátions divalentes e inibida por ADP, ATP e 5'- $\alpha,\beta$ -metileno-difosfato. Essa enzima catalisa a hidrólise de nucleosídeos 5'-monofosfatados até os respectivos nucleosídeos, sendo a enzima chave na via de degradação dos nucleotídeos e a principal fonte enzimática de adenosina no meio extracelular (Zimmermann, 1992). A ecto-5'-nucleotidase é amplamente distribuída em bactérias, células de plantas e tecidos de vertebrados, sendo classificada de acordo com a localização celular e propriedades bioquímicas. Além da função catalítica de produção de adenosina extracelular, tem-se

demonstrado que ecto-5'-NT/CD73 está envolvida em interações célula-célula e célula-matriz e em eventos de migração e adesão celular (Fastbom *et al*, 1987; Schoen *et al* 1988; Vogel *et al*, 1991).



**Figura 1:** Prognóstico da topografia das ectonucleotidasas de membrana. As NTPDases 1 – 4 são ligadas à membrana plasmática por dois domínios transmembrana (N e C- terminal). As NTPDases 5 e 6 perdem o domínio transmembrana C- terminal e podem ser clivadas próximo ao domínio N- terminal (setas) para formar uma proteína solúvel e liberada. Os quadros escuros representam a posição das cinco regiões conservadas da apirase. As NTPDases 1 – 3 são ectonucleotidasas típicas. A NTPDase 4 está localizada intracelularmente. As NTPDases 5 e 6 estão localizadas intracelularmente, mas podem ser clivadas e liberadas das células. A NTPDase 7 está localizada em vesículas intracelulares e a NTPDase 8 prefere sutilmente o ATP ao ADP. Os membros da família E-NPP são proteínas transmembrana tipo II com potencial para se tornar formas solúveis. As quatro formas de fosfatases alcalinas, bem como a ecto-5'-nucleotidase são ancoradas por glicosilfosfatidil inositol (GPI). Todas as proteínas são glicoproteínas. Adaptado de Zimmermann H. Drug Develop Res 52: 44-56, 2001.

### 1.3 ECTO-NUCLEOTIDASES E TUMORES

Muitos estudos vêm demonstrando o envolvimento do sistema purinérgico nos mais variados tipos de tumores. Em melanomas de humanos foi observado um aumento na expressão da ecto-apirase/CD39, sugerindo que esta proteína pode ser um marcador de

diferenciação tumoral, por apresentar gradual diminuição com a progressão do tumor (Dzhandzhugazyan *et al.*, 1998).

A recente identificação e caracterização bioquímica, não permitiram ainda o completo entendimento da função fisiológica da NTPDase5 (CD39L4) entretanto, foi demonstrado uma identidade molecular entre a NTPDase5 (CD39L4) e o proto-oncogene (PCPH), com indicações do envolvimento desta proteína no desenvolvimento neoplásico (Paez *et al.*, 2001).

Como foi anteriormente apresentado, o AMP formado por ação das ecto-NTDases é subseqüentemente hidrolisado pela ação da 5'-nucleotidase (ecto-5'-NT). Várias formas desta enzima têm sido descritas, mas apenas duas delas, a forma citosólica (Sala-Newby *et al.*, 1999) e a ecto-5'-NT (Zimmermann 1992) parecem participar efetivamente na formação de adenosina. A enzima citosólica produz adenosina que deve ser liberada das células para exercer seus efeitos farmacológicos sendo que sua presença e função em outros tecidos além do cardíaco e cerebral permanece por ser estabelecida. Por outro lado a enzima ligada à membrana (ecto-5'-NT, CD73) é amplamente encontrada em vários tecidos. A sua presença e atividade são variáveis dependendo do tecido estudado, sendo muito alta em fibroblastos e alguns carcinomas e muito baixa em células de origem hematopoiética (Spsychalla, 2000). A atividade da ecto-5'-NT é muito variável em células malignas. A atividade desta enzima é elevada em: carcinoma mamário (Canbolat *et al.*, 1996), câncer gástrico (Durak *et al.*, 1994), pancreático (Flocke & Mannherz, 1991) e glioblastoma (Bardot *et al.*, 1994, Fenoglio, *et al.*, 1997; Wink *et al.*, 2003a). Entretanto, dados da literatura apontam para um padrão de expressão desta enzima em células tumorais, relativamente complexo (Prager & Kanar, 1984; Thompson *et al.*, 1986; Fenoglio *et al.*, 1997; Ludwig, 1999; Spsychalla *et al.*, 1997). A ecto-5'-NT/ CD73 também parece ter

outras funções não relacionadas com sua atividade catalítica. Estudos em linfomas humanos têm identificado a molécula CD73 como uma proteína de adesão linfócito-vascular, a qual medeia a adesão dos linfócitos ao endotélio (Airas *et al.*, 1995). Um papel semelhante para ecto-5'-NT/CD73 como uma molécula de adesão tem sido proposto na invasividade de glioblastomas humanos (Fenoglio *et al.*, 1997). Em linfócitos, anticorpos contra CD73, em combinação com concentrações sub-mitogênicas de ésteres de forbol, induziram uma forte ativação de células T resultando em um aumento na proliferação e secreção de interleucina (IL-2), e expressão de seus receptores (Thompson *et al.*, 1989).

A adenosina extracelular pode ser recaptada por transportadores de nucleosídeos (Thorn e Jarvis, 1996), ou ser metabolizada por ação da ecto-adenosina deaminase. O papel fisiológico desta enzima é promover a degradação extracelular da adenosina, entretanto tem sido sugerido que a mesma pode exibir comportamentos extra-enzimáticos importantes (Franco *et al.*, 1997). Apesar de não ser o foco principal do presente trabalho, é importante salientar que tem sido sugerida também uma relação entre a deficiência desta enzima e desordens imunes e mieloproliferativas (Spychalla, 2000). Além disto, uma correlação positiva entre baixos níveis desta enzima e imunidade comprometida no câncer tem sido relatada (Dasmahapatra *et al.*, 1986). Fato é que, o ATP extracelular assim como a adenosina, produto de sua degradação, têm importante papel na comunicação celular podendo estar envolvidos nos mecanismos que afetam processos relacionados à fisiologia das células tumorais e imunidade dos tecidos. Assim, alterações na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo extracelular de nucleotídeos em tumores merecem ser investigadas.

Recentemente, nosso laboratório publicou evidências de que efetivamente a cascata de degradação do ATP extracelular está alterada em diferentes linhagens de gliomas de

ratos e de humanos quando comparada com as enzimas das células normais (astrócitos) (Wink *et al.*, 2003a). Além disto, dados preliminares apontam para a não expressão das enzimas da família das ecto-NTPDases enquanto que a ecto-5'-nucleotidase é expressa em todas as linhagens de gliomas estudadas (Wink *et al.*, 2003b).

## **2 OBJETIVOS**

Considerando que a participação dos receptores purinérgicos P2X tem sido amplamente estudada nos mecanismos relacionados com a percepção da dor e esvaziamento da bexiga, e o potencial papel dos receptores P2Y nos mecanismos de proliferação e invasão dos tumores de bexiga, bem como a participação das ectonucleotidases no controle dessa sinalização tem sido pouco estabelecida neste tipo de tumor, os objetivos do presente trabalho foram:

- investigar as enzimas envolvidas na degradação extracelular dos nucleotídeos,
- investigar a presença dos receptores purinérgicos e
- estudar o envolvimento do ATP extracelular na linhagem T24 de tumor de bexiga humana.

### ***3 CAPÍTULO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO***

CHARACTERIZATION OF ECTO-NUCLEOTIDASES IN T24 HUMAN BLADDER CANCER  
CELL LINE

Artigo que será submetido para publicação na Revista Urologic Oncology



**CHARACTERIZATION OF ECTO-NUCLEOTIDASES IN T24 HUMAN BLADDER CANCER  
CELL LINE**

**Stella J.<sup>1</sup>, Bavaresco L.<sup>1</sup>, Braganhol E.<sup>1</sup>, Wink M.R.<sup>4</sup>, Barrios C.H.<sup>3</sup>, Morrone F.B.<sup>1,2</sup>,  
Battastini A.M.O.<sup>1\*</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600- anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS),

<sup>4</sup>UNIVATES, Lageado, RS, Brasil.

**\* Corresponding author:**

Ana Maria Oliveira Battastini

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone number: 55 (51) 3316-5554

FAX number: 55 (51) 3316-5535

e-mail: [batas@terra.com.br](mailto:batas@terra.com.br)

## **Abstract**

Bladder cancer is the most commonly tumor occurring in urinary tract. The T24 cell is a lineage of human bladder transitional cell carcinoma, it has been used as model of invasive bladder cancer. Studies have demonstrated evidence for the relation between the purinergic signalling and tumour growth. Nucleotides are important molecules that regulate many pathophysiological functions in the extracellular space. Extracellular ATP is recognized as an agonist that mediates a wide variety of biological responses in the central and peripheral nervous systems. The nucleotide-mediated signaling is controlled by a highly efficient enzymatic cascade which includes the members of E-NTPDase (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase) family, E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) family and ecto-alkaline phosphatases. The AMP formed by the action of these enzymes is hydrolyzed to adenosine by the action of an ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT, CD73) . To evaluate the ecto-enzymes activities, the T24 bladder tumor cell line was incubated with specific substrates. Low rates of ATP and ADP hydrolysis were observed, in contrast with high hydrolysis of AMP. The T24 cell line was expressed E-NTPDase 5, E-NPP 1 and receptors P2Y. The regulation of the enzymatic cascade that hydrolyses ATP to adenosine is essential for the modulation of extracellular nucleotides concentration and, consequently, for the effect produced by these molecules on cells.

**Keywords:** Ectonucleotidases, phosphodiesterase, T24 bladder cell line.

## 1. Introduction

Bladder cancer is the most commonly tumor occurring in urinary tract, originating from normal stratified transitional epithelium of the bladder [1]. The incidence in men is higher than in women and it is associated with industrialization and related for occupational origin. More than 90% of histological cell type of bladder cancer is transitional cell carcinoma [2,3]. The T24 cell is a lineage of human bladder transitional cell carcinoma, have been used as a model of invasive bladder cancer.

Nucleotides, an important class of signaling molecules, are known to regulate many pathophysiological functions in the extracellular space. Extracellular ATP is recognized as an agonist that mediates a wide variety of biological responses in the central and peripheral nervous systems, largely by binding to either G protein-coupled receptors P2Y or ligand-gated P2X receptors [4].

The nucleotide-mediated signaling is controlled by a highly efficient enzymatic cascade which includes the members of E-NTPDase (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase) family, E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) family and ecto-alkaline phosphatases [5]. The AMP formed by the action of these enzymes is hydrolyzed to adenosine by the action of an ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT, CD73) [6].

In mammals, eight related enzymes that hydrolyze extracellular tri- and diphosphonucleosides (named NTDPase 1–8) have been cloned and characterized by the presence of five 'apyrase conserved regions' (ACRs). NTPDase 1 (CD39, ecto-apyrase), NTPDase 2 (CD39L1, ecto-ATPase), NTPDase 3 (CD39L3), NTPDase 4 (UDPase), NTPDase 5 (CD39L4, ER-UDPase, PCPH), NTPDase 6 (CD39L2), NTPDase 7 (LALP1) and NTPDase 8 [5,7]. Changes in the NTPDase activities have been shown in different pathological conditions.

For instance, altered expression of these enzymes has been described in tumor cells from different origins [8-10]. In addition, the involvement of ecto-5'-NT in drug resistance and tumor-promoting functions has been proposed [11,12]. Recent studies from our laboratory have demonstrated a possible involvement of ecto-nucleotidases as indicators of invasiveness and aggressiveness of malignant gliomas [13-15].

The other group of enzymes involved in the extracellular nucleotide degradation is the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) family. This class of enzymes contains seven members (NPP1-7). NPP1-3 has a short intracellular N-terminal and NPP4-5 have a C-terminal domain too. Three members (NPP1-3), characterized by a similar molecular structure have a broad substrate specificity which may reflect their role in various physiological and biochemical processes including bone mineralization and calcification, modulation of purinergic receptor signalling, regulation of extracellular pyrophosphate levels, nucleotide recycling, cell motility. Abnormal E-NPPs expression is involved in many pathological conditions as invasion and metastasis of cancer cell. NPP2 and NPP3 are related with increased tumor motility and invasion [16,17].

Although several lines of evidence have indicated that extracellular ATP play primordial role in the urinary tract and these actions are mediated by P2 receptors [18-20], few data are available regarding on ectonucleotidases activities. Based on the wide distribution of ectonucleotidases in various tissues and considering the potential participation of these enzymes in the regulation of purinergic signaling in normal and tumoral bladder tissues, the objective of this study was to examine the activity of ecto-enzymes and the presence of the purinergic receptors in T24 human bladder tumor cell line.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

RPMI 1640, trypsin/ EDTA and fungizone were purchased from Gibco (Gibco BRL, Grand Island, New York, USA). Fetal calf serum (FCS) was from Cultilab (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). All chemicals and other reagents were from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Maintenance of cell line

Human T24 bladder cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Cells were grown in culture flasks in RPMI 1640 medium / 10% (v/v) fetal calf serum (FBS) (v/v), containing antibiotics penicillin/streptomycin 0,5 U/mL and seeded in 24- well plates (TTP plates) at densities of  $1 \times 10^4$  cells/ well in 500  $\mu$ L medium per well. Culture cells were maintained in 5% CO<sub>2</sub>/ 95% air at 37°C and allowed to grow to confluence.

### 2.3. Ecto-nucleotidases assay

To determine the E-NTPDase activities, the 24- well microplates containing T24 bladder cells were washed three times with incubation medium in absence of nucleotides. The reaction was started by the addition of 200  $\mu$ l of the incubation medium containing (final concentration) 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM Hepes, pH 7.4 and 2.5mM of one of these nucleotides: ATP, GTP, CTP, ITP, UTP, ADP, GDP, CDP, IDP or UDP, at 37°C. The nucleotide concentrations and the incubation time were chosen to assure the linearity of

the reaction (data not shown). The reaction was stopped by taking an aliquot of the incubation medium, which was transferred to an eppendorf tubes containing trichloroacetic acid (10% w/v) previously placed on ice. The production of inorganic phosphate (Pi) was measured using the malachite green method (Chan *et al.*, 1986), with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as the Pi standard. The nonenzymatic Pi released from nucleotide into the assay medium without cells and Pi released from cells incubated without nucleotide were subtracted from the total Pi released during incubation, giving net values for enzymatic activity. All samples were run in triplicate.

To evaluate the monophosphates nucleosides and phosphate esters hydrolysis, the incubation medium was the same as that used for E-NTPDase activity, except that 2mM  $\text{MgCl}_2$  was used instead of  $\text{CaCl}_2$ . Substrates tested were 2mM of AMP, IMP, GMP, CMP or UMP, inorganic pyrophosphate (PPi), 6-Phosphate glucose (Gli-6P) or  $\beta$ -Glicerophosphate as substrate. The other conditions were the same as used to determine nucleosides di- and tri-phosphates hydrolysis. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

#### 2.4. Assay of Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity

The phosphodiesterase activity was assessed using *p*-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP – an artificial marker substrate that is used routinely for the *in vitro* assay of this activity) as previously outlined (Sakura *et al.*, 1998). The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8.9 was used. The enzyme reaction was started by the addition of *p*-Nph-5'-TMP to a final concentration of 0.5 mM. After 60 minutes of incubation, an aliquot of the incubation medium was withdrawn and transferred to eppendorf tubes containing 150  $\mu\text{L}$  0.2 N NaOH. The amount of *p*-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar

extinction coefficient of  $18.8 \times 10^{-3}/M/cm$ . All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were expressed as nmol *p*-nitrophenol released /min/mg of protein.

## 2.5. Protein determination

Human T24 bladder cells in the 24-well microplates were solubilized with 100  $\mu$ L NaOH (1.0 N) and frozen overnight at  $-20^{\circ}C$ . An aliquot from thawed material was used for protein determination by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

## 2.6. RT-PCR analysis

Total RNA from T24 cell line culture was isolated with Trizol LS reagent (Life Technologies) in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA species were synthesised with M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin, USA), from 5  $\mu$ g total RNA in a final volume of 25  $\mu$ l with a random hexamer primer in accordance to the manufacturer's instructions. cDNA reactions were performed for 1 h at  $37^{\circ}C$  and stopped by freezing at  $4^{\circ}C$ . One microliter of cDNA was used as a template for PCR with primers specific for E-NTPDases family, NPPs family, ecto-5'-nucleotidase/CD73 and purinoceptors. As a control for cDNA synthesis, GAPDH-PCR was performed. One microliter of the RT reaction mix was used for PCR in a total volume of 20  $\mu$ l using a concentration of 0.5  $\mu$ M of each primer indicated below and 50  $\mu$ M of dNTP and 1 U Taq polymerase (CenBiot-UFRGS, Porto Alegre, RS, BR) in the supplied reaction buffer. The annealing temperatures were: E-NTPDase 1, 3, 4, 5 and ecto- 5'-nucleotidase/CD73,  $52^{\circ}C$ ; E-NTPDase 2,  $59^{\circ}C$ ; GAPDH,  $50^{\circ}C$ . The PCR cycling conditions were as follows: 1 min at  $95^{\circ}C$ , 1 min at  $94^{\circ}C$ , 1 min at annealing

temperature, 1 min at 72°C. All PCRs were carried out for 35 cycles and included a final 10 min extension at 72°C. Ten microliters of the PCR reaction were analyzed on a 1.0 % agarose gel. The following set of primers were used: E-NTPDase1 (5'ATG GCA AGG ACT ACA ATG3' and 5'GAA AAG CAG TAT TCA CTC A3'); ENTPDase2 (5'CAG GAT GTG CCC AAA GAG A3' and 5'CCC CAT TGA AAG AGC ATC G3'); ENTPDase3 (5'TAC CGA ACT CCA ACC ATC A3' and 5' CCT TGA CTT TTT GCA TAC A3'); ENTPDase5 (5'AAG GCA ACA GCA GGA CTA C3' and 5' AAT CCA AAT CCC AAG TAA C3'); ENTPDase6 (5'GTG TGG GCG TGT TCA TCT A3' and 5' CCT TCA TCT GTT CCG TTC A3'); ecto-5'-nucleotidase/CD73 (5'GAT CGA GCC ACT CCT CAA A 3' and 5'GCC CAT CAT CAG AAG TGA C3'); NPP1 (5'GAA TTC TTG AGT GGC TAC AGC TTC CTA3' and 5'CTC TAG AAA TGC TGG GTT TGG CTC CCG GCA3'); NPP2 (5'GAA AAT GCC TGT CAC TGC TC3' and 5'GCT GTA ATC CAT AGC GGT TG3'); NPP3 (5'AGC CGC CGG TTA TCT TGT TCT C3' and 5'TGA TGC CGT GCG ACT CTG GAT AC3'); P2Y1 (5' TGTTCAATTTGGCTCTGGC 3' and 5'AGATGAAATAACTTCGCAGG3'); P2Y2 (5'CTTCGCCCTCTGCTTCCTG3' and 5' TTGGCATCTCGGGCAAAGC3'); P2Y4 (5'GGCATTGTCAGACACCTTG3' and 5'AAGACAGTCAGCACACAG3'); P2Y6 (5'CGCTTCCTCTTCTATGCCA3' and 5'AGGCTGTCTTGGTGATGTG 3'); P2Y11 (5' CTTCTCTTACCTGCAAC 3' and 5' AGGCTATACGCTCTGTAGG3'); P2Y12 (5'TTAGTGATGCCAAACTGGG3' and 5'GGTCAGAATCATGTTAGGC3'); P2Y13 (5'GCCGACTTGATAATGACAC3' and 5'ATGATCTTGAGGAATCTGTC3'); P2Y14 (5'TCTTTTACGTGCCCAGCTC3' and 5'CTGTCAAAGCTGATGAGCC3'); P2Y15 (5'TGTATCTGACCAGCCTCCC3' and 5'GATTGATCCGAATGACCC3'); GAPDH (5'CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC3' and 5'CCA TGG AGA AGG CTG GGG 3'). Oligonucleotides were obtained from Invitrogen



(Invitrogen Co., Carlsbad, California, USA). Negative controls were performed with templates substituted by DNase, RNase free distilled water for each PCR reaction.

### *2.7. ATP treatment*

To determine the effect of extracellular ATP, the T24 cells were seeded at  $1 \times 10^4$  cells/well in RPMI 1640, supplemented with 10% FBS using 24-well plates microplates. After semi-confluence the cells were exposed to extracellular ATP (1, 2 and 5mM) for 24h and 48h. At the end of ATP treatment, the medium was removed, cells were washed with CMF and 100  $\mu$ L of 0.25% trypsin/ EDTA solution were added to detach the cells, which were counted in a haemocytometer.

### *2.8. Statistical Analysis*

The results are presented as means  $\pm$  SD of at least three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by ANOVA, followed by Tukey's test. P values  $<0.05$  were taken to indicate statistical significance.

## **3- Results**

To evaluate the degradation of tri- and diphosphonucleotides the T24 bladder tumor cell line was incubated with ATP, GTP, CTP, ITP, UTP, ADP, GDP, CDP, IDP and UDP as substrates. Figure 1 shows that T24 cell line presented very low specific activities against all tri- and di-phosphate nucleosides investigated. Furthermore, all nucleoside-5'-triphosphates, except UTP, were hydrolyzed with higher catalytic activity than the respective nucleoside-5'-diphosphates.

One important characteristic observed with T24 cell line was its higher capacity to hydrolyze nucleoside monophosphates (AMP, IMP, GMP, CMP and UMP) when compared to the nucleoside tri- and diphosphates (Figure 2A).

A possible participation of ecto-alkaline phosphatases in the nucleotide hydrolysis was excluded because T24 cells did not hydrolyze glucose-6-phosphate (Gli-6P) and B-glycerophosphate, two potentially hydrolysable substrates of these enzymes. However, a high inorganic pyrophosphatase activity was observed indicating a possible existence of an enzymatic activity that produces inorganic pyrophosphate on their cell surface. (Figure 2B). Considering this high activity observed when the T24 cells were incubated with inorganic pyrophosphate we have decided to evaluate the presence of an ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP). Figure 3 shows that 5'-TMP, a specific substrate for E-NPPs, was hydrolyzed at alkaline pH 8.9 (the optimal pH for these enzymes), demonstrating the presence of enzymes able to hydrolyze phosphodiester bonds in T24 tumor cells. However, low 5'-TMP hydrolysis was observed in the physiological pH, which indicates that although these enzymes could be presented they are not participating in the nucleotide hydrolysis in our assay conditions.

To better characterize the extracellular nucleotide hydrolysis found in this cell line, we used PCR analysis and the pattern of expression of ecto-nucleotidase family was performed. When the E-NTPDase members were analyzed (Figure 4A), only the E-NTPDase 5 was expressed in this tumor cell line, revealing a specific signal at correspondent molecular weight (359 bp fragment). The E-NTPDase profile expression found in T24 cell line was in according to nucleotide hydrolysis pattern profile exhibited by these cells, which poorly hydrolyzed both tri and di-phosphates nucleosides. Moreover, the ability that T24 cells presented to hydrolyze UDP preferentially over UTP is a characteristic presented by E-NTPDase 5.

E-NTPDase 5 was shown to be identical to PCPH gene, a human proto-oncogene product that was discovered after its activation upon treatment with a chemical carcinogen [21]. Since membrane-bound and circulating ecto-enzymes reduce excess levels of nucleosides/nucleotides, maintaining normal physiology and health, the absence of expression of other E-NTPDases investigated could have implications outside of tumoral cells. For instance, it has been reported by our group that alterations in purinergic system in glioma cell line are related to proliferation stimuli.

The ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity is a major contributor to the cascade that hydrolyses extracellular ATP to adenosine, representing the rate-limit step of the purinergic signaling. Since this cell line efficiently hydrolyzed extracellular AMP and other mono-nucleosides investigated, we investigated the mRNA expression of the ecto-5'-nucleotidase/CD73. As expected, T24 cell line revealed specific signal (437 bp fragment) corresponding to mRNA for ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Figure 4C).

After a characterization of ecto-enzymes we have decided to investigate the presence of purinergic receptors in T24 cell line. Figure 5 show the RT-PCR test performed. It identified the presence of the all the receptors P2Y (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>, P2Y<sub>15</sub>), These data are interesting because studies have demonstrated that P2Y<sub>1</sub> receptor mediates a decrease in cell number whereas the P2Y<sub>2</sub> receptor subtype mediates an increase in cell number, probably being activated by different concentrations of ATP.

In the present study we also investigated the effect of extracellular ATP in the T24 tumor bladder cell line. As it is shown in the figure 6, the extracellular ATP (1, 2 and 5 mM) caused a high decrease in cell number after 24h and 48h of treatment when compared to the control. A more detailed and complete study is necessary to better investigate how the extracellular ATP acts to decrease the cell number.

#### 4- Discussion

In the present study, we evaluated the presence of purinergic receptors and ectonucleotidases in the T24 malignant bladder cell line. ATP is a multifunctional molecule that acts intracellularly as the primary source of energy for living cells and also extracellularly as a signaling molecule that regulates diverse processes including synaptic transmission, nociception, ion transport, apoptosis, secretion, and bladder contraction [22-24].

Several studies have demonstrated evidence for the relation between the purinergic signalling and tumour growth. For example, gliomas present low ATP hydrolysis and high rates of AMP degradation when compared with normal cells [13]. It has also been demonstrated that the co-injection of apyrase significantly diminishes the growth of implanted gliomas in rats after twenty days of tumor induction [15].

Extracellular nucleotides are important messengers both in physiological as well as in pathological conditions. The regulation of the degradation cascade from ATP to adenosine is fundamental for the regulation of extracellular nucleotides and the effect which these molecules have on cells. Our results show that T24 cell line presents an extremely decreased capacity to hydrolyze all tri- and di-phosphate nucleosides (Figure 1) when compared to the nucleoside monophosphates, which have a higher capacity to hydrolyze (Figure 2A). The results obtained show a low expression of E-NTPDases, contrasting to a significant activity of ecto-5'-nucleotidase, and at least one of the enzymes family of E-NPPs. These results suggest that the increase potential to generate adenosine may be an important alteration during tumor progression.

Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs) show a distinct but overlapping distribution and have been detected in almost all tissues [25]. Multiple physiological roles for E-NPPs have been related, including nucleotide recycling and

modulation of purinergic receptor signaling [16]. In the present study, we describe an enzyme activity in T24 cell line in the optimum pH for E-NPPs and in physiological pH to the culture cells. Time and substrate curve have shown an E-NPP activity only in the enzyme optimal pH. The RT-PCR analysis showed the presence of only the E-NPP1,(Figure 4B) which is proposed to function in nucleotide recycling and the generation of intravesicular and extracellular PPI.

Regarding the expression of the ecto-enzymes, our study has showed that the T24 cell line expresses only the E-NTPDase 5 (CD39L4) and do not express the other E-NTPDases (Figure 4A). This result was in accordance to the nucleotide hydrolysis profile exhibited by T24 cell line, which presented a higher hydrolysis of the nucleosides di-phosphate, especially UDP, when compared to triphosphate-nucleosides. E-NTPDase 5 was shown to be identical to the PCPH gene, a human proto-oncogene product, which was discovered after its activation upon treatment with a chemical carcinogen [21].

The evaluation of AMP hydrolysis indicated a high ecto-5'-NT activity. In fact, its known that adenosine formed by AMP may be involved in tumorigenesis in several carcinomas. Frequently the elevated activity of ecto-5'-NT was found in malignance of epithelial origin [12].

Purinergic signalling has been studied in many different types of cancer [26], and ATP and its analogues have been demonstrating to alter the growth of primary cultures and human cell lines of various cancers types [27]. Shabbir et al, in 2004, suggested that ATP administration is particularly effective in treating bladder tumors when combined with the more commonly used anticancer drug, mitomycin. We have identified all P2Y receptors in the cell line studied (Figure 5), supporting the idea that the alteration of cancer cell number might be due to modulation of cell proliferation by P2 receptors. Although these receptors are involved in normal bladder, they may be especially important in diseased bladder [28,29].

In this study we also investigated the effects of extracellular ATP in T24 cell line in different concentrations and times of treatment (Figure 6). As shown, the extracellular ATP significantly decreased the cell number, but we did not know yet which pathway may be altered to cause this effect.

These data could indicate that the purinergic signalling pathways may play an important role in regulating urinary bladder function. Further studies to provide functions for the purinergic system in bladder tumor will be necessary to improve the possibilities of antitumor therapies.

## 5. References

- 1- Przybylo M, Litynska A, Pochec E; *Different adhesion and migration properties of human HCV29 non-malignant urothelial and T24 bladder cancer cell: role of glycosylation*; Biochimie 87: 133-142; 2005.
- 2- Lamm DL and Torti FM; *Bladder Cancer, 1996*; CA- A cancer Journal For Clinicians 46: 93-112; 1996.
- 3- Zeegers MPA, Swaen GMH, Kant I, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA; *Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands*; Occupational Environ Med 58: 590-596; 2001.
- 4- Ralevic V, Burnstock G; *Receptors for purines and pyrimidines*; Pharmacology Revue 50: 413-492; 1998.
- 5- Zimmermann H; *Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature*; Drug Development Research 52:44-56; 2001.
- 6- Zimmermann H; *5'-Nucleotidase-molecular structure and functional aspects*; Biochem. J. 285: 345-365; 1992.
- 7- Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJG, Sévigny J; *Cloning and Characterization of Mouse Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-8*; Biochemistry 43:5511-5519; 2004.
- 8- Dzhandzhugazyan KN, Kirkin AF, Straten PT, Zeuthen J; *Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas*; FEBS Letters 430: 227-230; 1998.
- 9- Kittel A, Garrido M, Vargas G; *Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas*; J. Histochem. Cytochem. 50: 549-555; 2002.

- 10-**Blauquez MI, Areras MI, Conde I, Tirado OM, Paniagua R, Notário V; Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in human breast cancers; *Int. J. Oncology* 4: 821-830; 2004.
- 11-**Ujhazy P, Berleth ES, Pietkiewicz JM, Kitano H, Skaar JR, Ehrke MJ, Mihich E; *Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance*; *Int. J. Cancer* 68: 493-500; 1996.
- 12-**Spychala J; *Tumor-promoting functions of adenosine*; *Pharmacol. Ther.* 87: 161-173; 2000.
- 13-**Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Schwartzmann G, Sarkis JJF, Battastini AMO; *Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines*; *Cancer Letters* 198: 211-218; 2003.
- 14-**Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJ, Salbergo CG, Lenz G, Battastini AMO; *Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity*; *Journal of Neuro-Oncology* 71(2): 135-40; 2005.
- 15-**Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann PW, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MIA, Lenz G, Battastini AMO; *Involvement of extracellular ATP on the glioblastoma growth in a rat glioma model*; *paper in press*; 2006.
- 16-**Goding JW, Grobber B, Slegers H; *Physiological and pathophysiological functions of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family*; *Biochimica et Biophysica Acta* 1638: 1-19; 2003.
- 17-**Bollen M, Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C; *Nucleotide Pyrophosphatases/Phosphodiesterases on the Move*; *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35: 393-432; 2000.



- 18-**Tempest HV, Dixon AK, Turner WH, Elneil S, Sellers LA, Ferguson DR; *P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptor expression in human bladder urothelium and changes in interstitial cystitis*; BJU Int 93: 1344-1348; 2004.
- 19-**Burnstock G; *Introduction: P2 receptors*; Current Topics in Medicinal Chemistry 4: 793-803; 2004.
- 20-**Burnstock G; *Purinergic signalling*; British Journal of Pharmacology 147: s172-s181; 2006.
- 21-**Paez JG, Recio JÁ, Rouzaut A, Notario V; *Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4 (ENTPDase5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene*; Int Journal Oncology 19: 1249-1254; 2001.
- 22-**Burnstock G; *Purine-mediated signalling in pain and visceral perception*; Trends Pharmacology 22: 182-188; 2001.
- 23-**Novak I; *ATP as a signaling molecule: the exocrine focus*; News Physiological 18: 12-17; 2003.
- 24-**Cooke HJ, Wunderlich J, Christofi FI; *“The force be with you”: ATP in gut mechanosensory transduction*; Neuroscience Physiology Sci 18: 43-49; 2003.
- 25-**Bollen M, Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C; *Nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterases on the move*; Crit Ver Biochem Mol Biol 35: 393-432; 2000.
- 26-**Abraham EH, salikhova AY, rapaport E; *ATP in the treatment of advanced cancer*; Curr. Top. Membr. 54: 415-452; 2003.
- 27-**Morrone FB, Jacques-Silva Maria C., Horn AP, Bernardi A., Schwartzmann G, Rodnight R, Lenz, G; *Extracellular nucleotides and nucleosides induce*

*proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell line; J Neuro-oncology* 64: 211-18; 2003.

**28-**Rapp DE, Lyon MB, Bales GT, Cook SP; *A role for the P2X receptor in urinary tract physiology and in the pathophysiology of urinary dysfunction; Europe urology* 48: 303-308; 2005.

**29-**White N, Burnstock G; P2 receptors and cancer; *Trends in Pharmacological Sciences* 27: 211-217; 2006.

## 6. Legends

**Figure 1: Substrate specificity for nucleosides di- and triphosphates in T24 bladder cancer cell line.** After confluence, cells were incubated with different nucleosides triphosphates (black bars) or diphosphates (hatchet bars) as described in Materials and Methods. Bars represent mean  $\pm$  SEM of three independent experiments done in triplicate. Specific activity values are expressed as nmol Pi/ min/ mg of protein.

**Figure 2: Substrate specificity for hydrolysis of nucleosides monophosphates and phosphatate esters in T24 bladder cancer cell line.** After confluence, T24 human bladder cells were incubated with nucleosides monophosphates (A) and different phosphatate esters (B) as described in Material and Methods. Bars represent mean  $\pm$  SEM of three independent experiments done in triplicate. Specific activity values are expressed as nmol Pi/ min/ mg of protein.

**Figure 3: Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPPs) activity.** After confluence, T24 cells incubated with *p*-Nph-5'-TMP in both pH 7,4 and 8,9 as described in Material Methods. Specific activity values are expressed as nmol *p*-nitrophenol/ min/ mg of protein. The values represent means  $\pm$  SEM from three independent experiments with triplicate determinations in each.

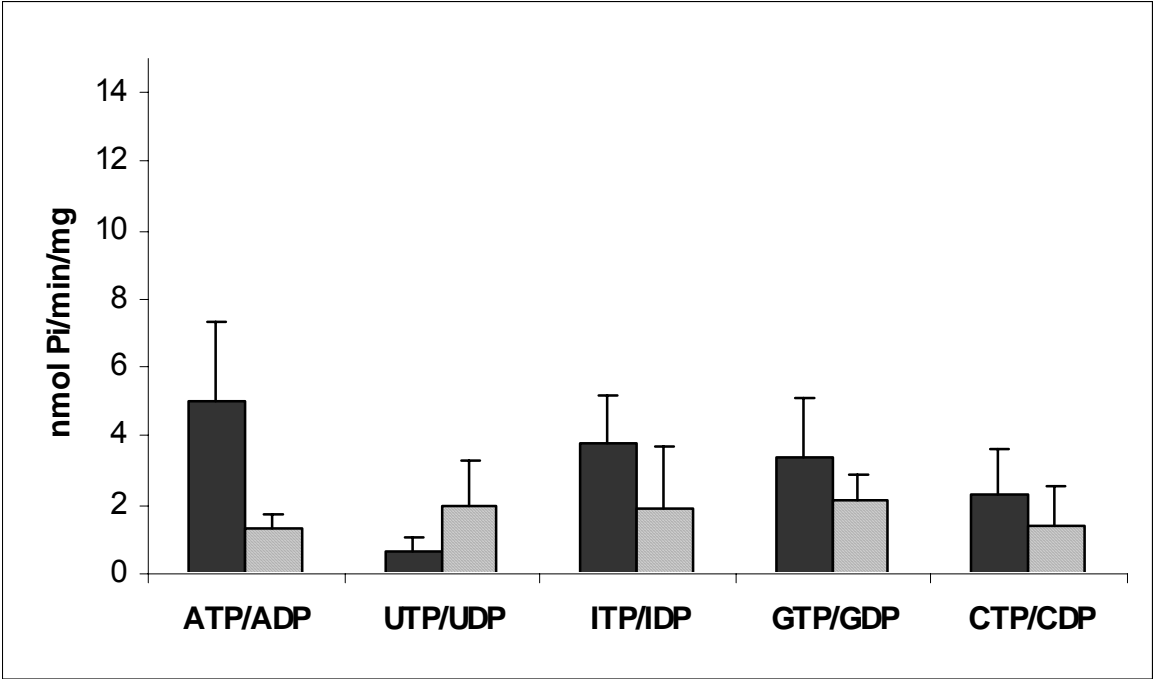
**Figure 4: RT-PCR analysis of ecto-nucleotidases expression in T24 cells.** After confluence, total RNA was isolated from cells and processed for analysis of

ecto-nucleotidases expression. The PCR products were separated on a 1% agarose gel. The length (bp) of the PCR products obtained is given for each reaction. (A) RT-PCR analysis of E-NTPDases, (B) RT-PCR analysis of E-NPPs and (C) RT-PCR analysis of ecto-5'-NT.

**Figure 5: RT-PCR analysis of purinergic receptors P2Y.** After confluence, total RNA was extracted and processed for analysis of purinergic P2Y expression. The PCR products were separated on a 1% agarose gel. The length (bp) of the PCR products obtained is given for each reaction.

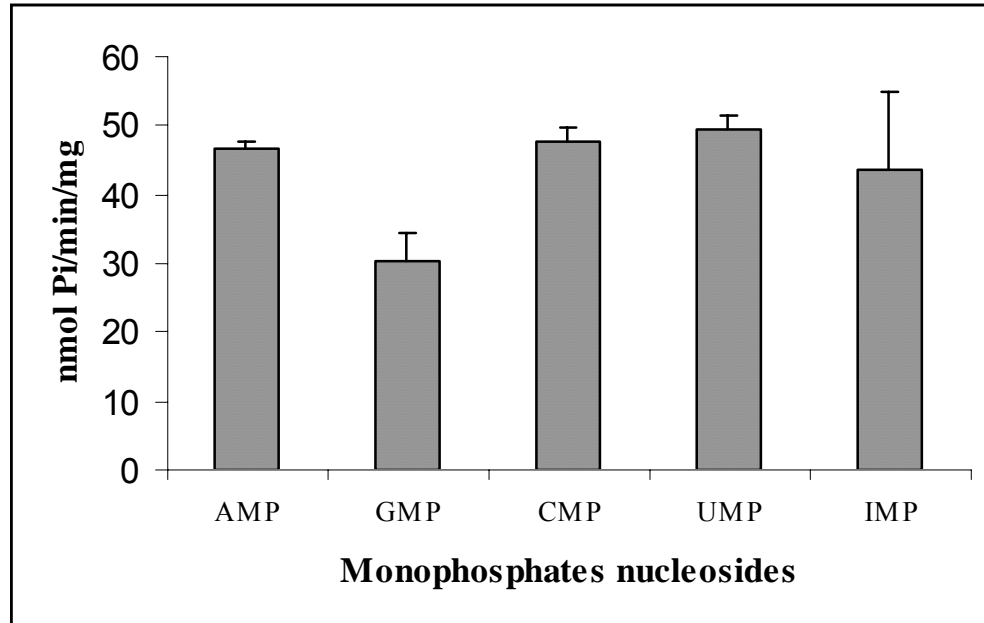
**Figure 6: Effect of ATP on cell proliferation:** Semi-confluence cultures of T24 cells were treated with ATP (1,2 and 5 mM) during 24h (black bars) and 48h (hatchet bars). After that, cells were detached with 0.25% trypsin-EDTA and counted in haemocytometer. Data are the means  $\pm$  SEM of three independent experiments with triplicate determination in each. The effect was statistically different in relation to control at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  as determined by ANOVA followed by Tukey test.

Figure 1



**Figure 2**

**A**



**B**

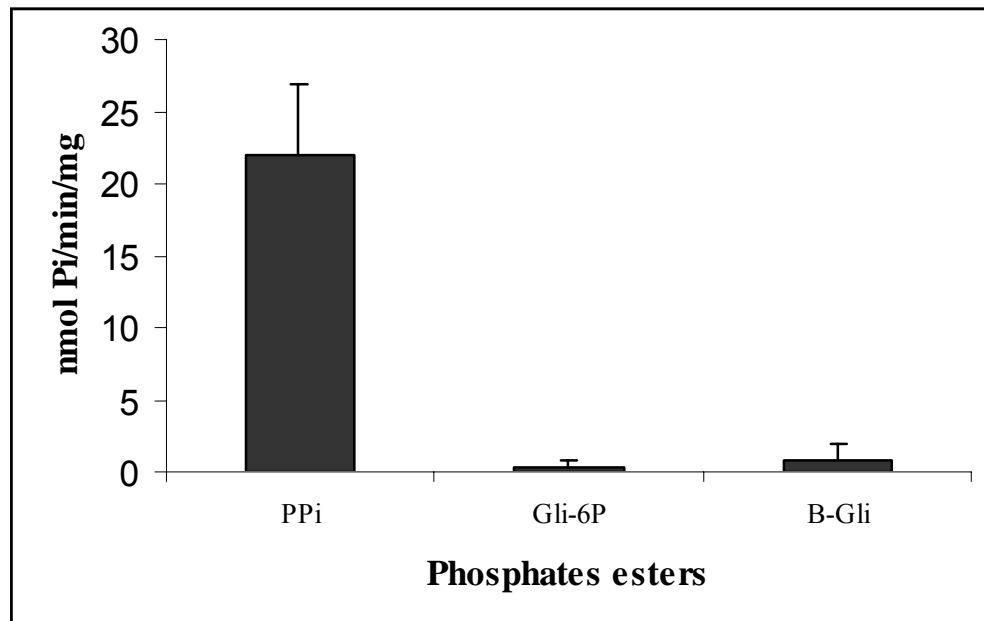
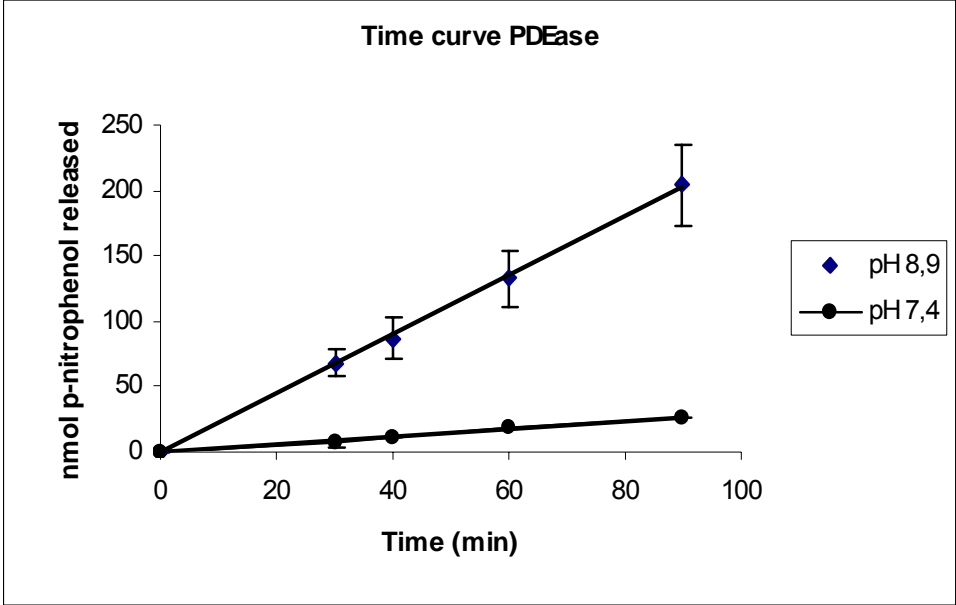
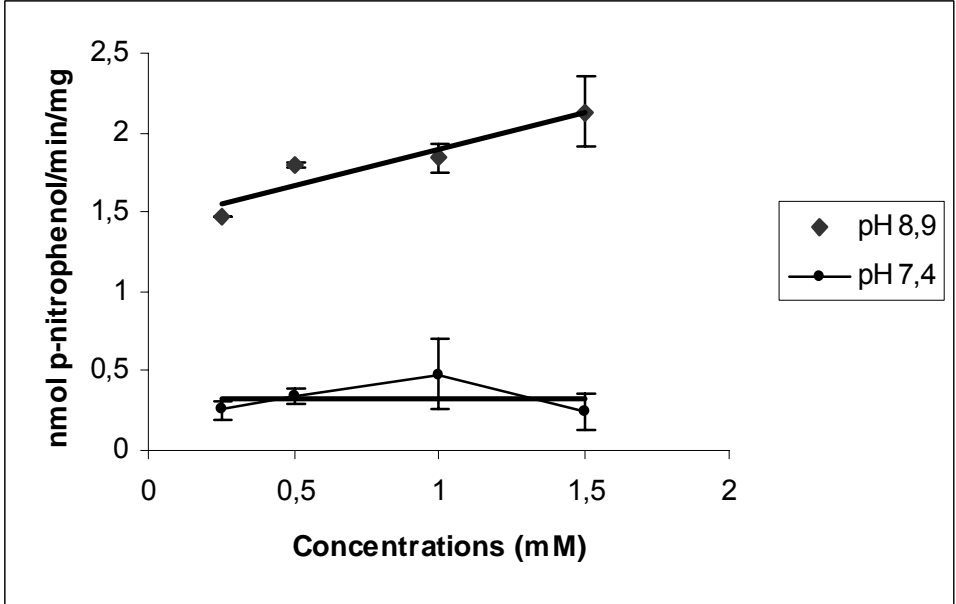


Figure 3

A

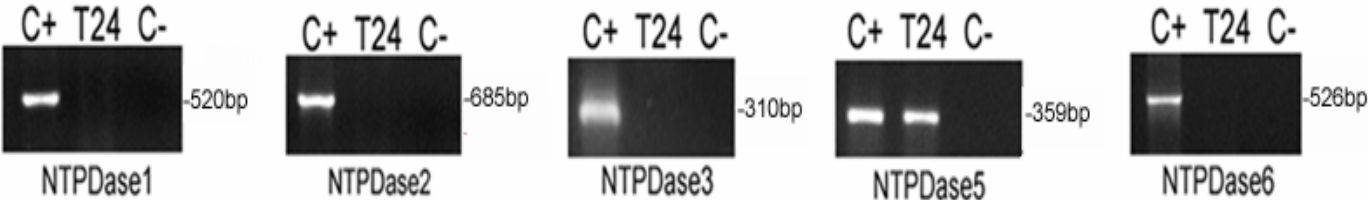


B

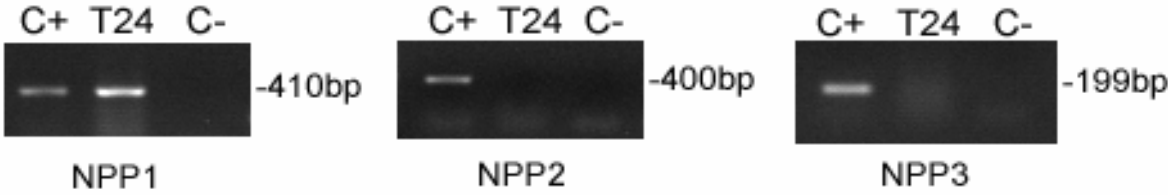


**Figure 4**

**A**



**B**



**C**

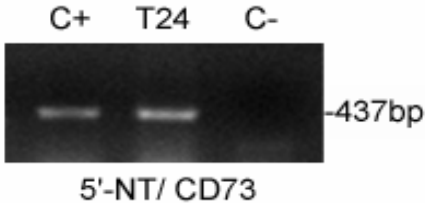




Figure 5

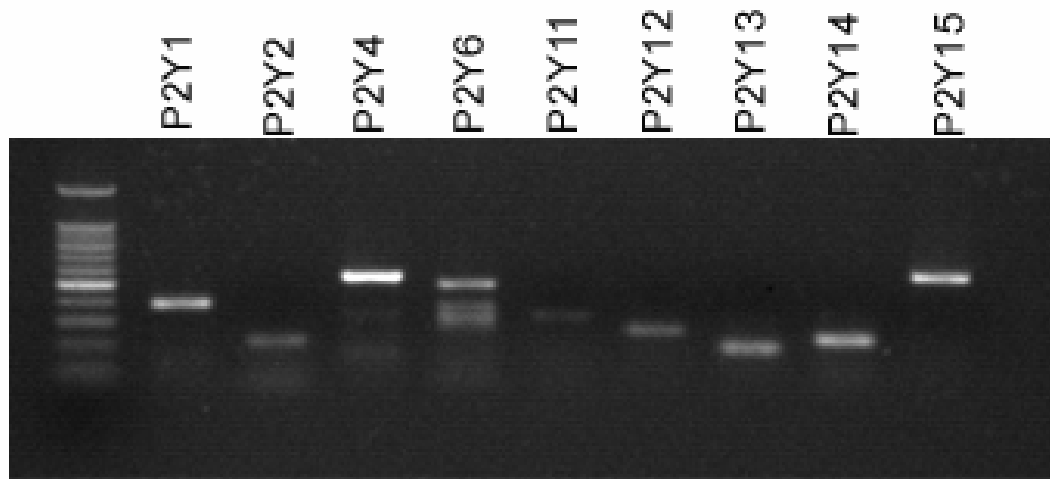
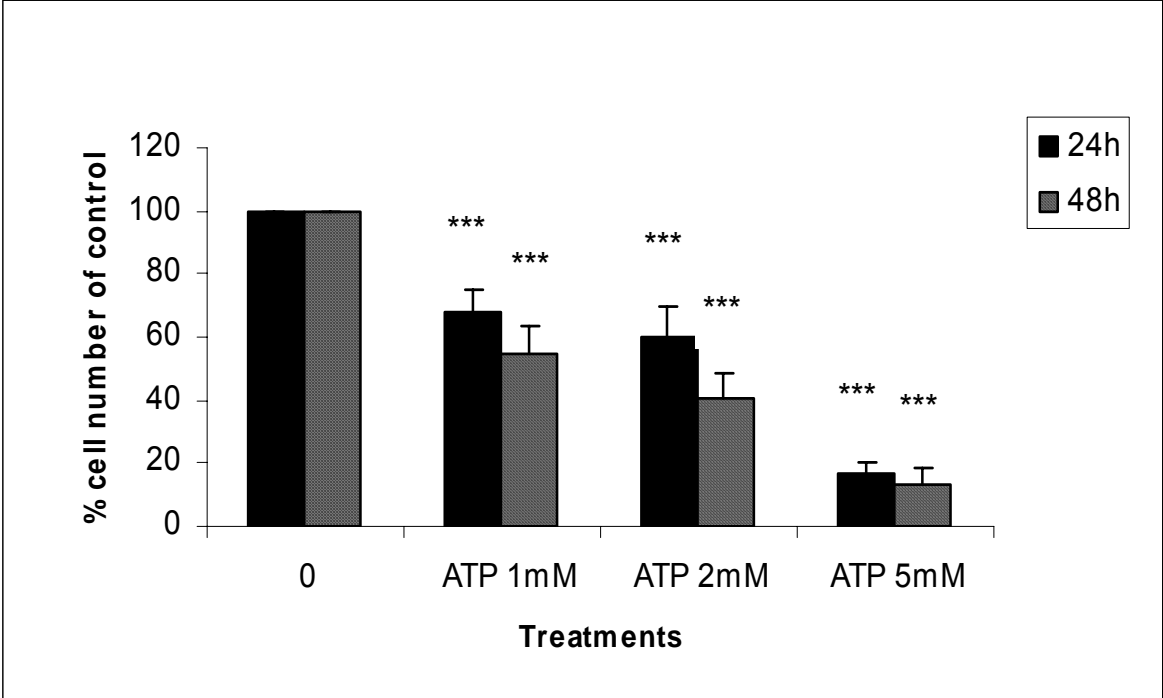


Figure 6



## **4 DISCUSSÃO**

### **4.1 ECTO-NUCLEOTIDASES EXPRESSAS EM LINHAGEM DE TUMOR TRANSICIONAL DE BEXIGA**

O sistema purinérgico pode estar envolvido com o desenvolvimento tumoral em vários tipos de cânceres, entre eles, gliomas, melanoma e carcinoma epitelial intestinal. Vários estudos têm demonstrado que alterações nas ecto-nucleotidases podem estar relacionadas ao desenvolvimento de diferentes tumores (Coutinho-Silva *et al.*, 2005, White *et al.*, 2005).

A ação dos nucleotídeos no meio extracelular termina pela ação de uma cascata enzimática que degrada seqüencialmente nucleosídeos 5'-trifosfatos até seus respectivos nucleosídeos monofosfatados e fosfato livre ou pirofosfato. Conforme citado anteriormente, existe um número significativo de enzimas de superfície com potencial para hidrolisar os nucleotídeos extracelulares e entre elas estão as E-NTPDases e as E-NPPs (Zimmermann, 1999; 2001). Estudos prévios têm relatado que as células e tecidos podem co-expressar ecto-nucleotidases distintas que compartilham características comuns (Heine *et al.*, 1999; Kukulski *et al.*, 2003; Wink *et al.*, 2006). Como essas enzimas apresentam diferentes características cinéticas, elas podem agir em diversas condições fisiológicas e podem ser diferentemente reguladas.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado alterações nas atividades das enzimas responsáveis pela degradação extracelular de nucleotídeos em condições patológicas e fisiológicas nas mais diversas frações biológicas. Foram demonstradas fortes evidências da relação da sinalização purinérgica com o crescimento e progressão de tumores,

especialmente gliomas. Wink e colaboradores, em 2003, demonstraram que os gliomas apresentam baixas taxas de hidrólise de ATP e altas taxas de hidrólise de AMP quando comparados com células normais (astrócitos). Também foi demonstrado que a enzima apirase diminui significativamente o tamanho do tumor, bem como o índice mitótico em ratos implantados com gliomas (Morrone *et al.*, 2006). Além disso, considerando os estudos recentes que relacionam a E-NTPDase 5 (CD39L4) com o proto-oncogene PCPH e que demonstram a diferente expressão desta enzima em vários tipos tumorais (Rouzaut *et al.*, 2001; Recio *et al.*, 2002), resolvemos investigar a expressão das E-NTPDases na linhagem tumoral de bexiga humana T24. Os nossos estudos demonstraram que a linhagem de tumor de bexiga T24 expressa apenas a E-NTPDase 5 (CD39L4) não expressando as demais E-NTPDases.

A NTPDase5 (CD39L4) está localizada em membranas intracelulares sendo potencialmente secretável para o meio extracelular através de padrões secretórios tradicionais em mamíferos (Mulero *et al.*, 1999, 2000). Esta enzima tem maior preferência por nucleosídeos difosfatados (NDPs) em especial, GDP, UDP e IDP, em relação aos trifosfatados (Murphy-Piedmonte *et al.*, 2005; Mulero *et al.*, 2000). Entretanto, nossos resultados, ao contrário de referências já estabelecidas (Mulero *et al.*, 2000), mostraram que apenas o nucleotídeo difosfatado UDP apresentou uma hidrólise maior do que seu nucleotídeo trifosfatado relacionado (UTP), enquanto que os demais apresentaram uma hidrólise trifosfatada superior à hidrólise difosfatada (Figura 1).

A elevada hidrólise apresentada pelos nucleotídeos monofosfatados (Figura 2A) na linhagem de tumor de bexiga pode nos levar a uma comparação com outras linhagens tumorais, como linhagens de gliomas de ratos e humanos que apresentaram o mesmo perfil de hidrólise (Wink *et al.*, 2003a), mostrando que esta característica pode estar relacionada

com a tumorigênese celular, ou seja, pode ser uma característica comum a diversos tipos de tumores e utilizada como parâmetro de análise de carcinogenicidade.

Outro dado importante a ser considerado é que a deleção do cromossomo 9 é uma alteração genética comum que ocorre em carcinoma de células transicionais (TCC) de bexiga (Knowles *et al.*, 2003) e esta deleção também está relacionada com câncer renal (Povey *et al.*, 1997). Curiosamente, o gene da E-NTPDase 2 está situado no cromossomo 9q34.3 (Chadwick e Frischauf, 1997), uma região do cromossomo 9. Essa é também a região definida para o gene da desordem genética humana da TSC1 (*tubular sclerosis I*) também chamada de hamartina, caracterizada pelo generalizado desenvolvimento de tumores distintos, chamados hamartomas ou células gigantes de astrocitoma subependimal (SGCA) (Slegtenhorst *et al.*, 1997; Gutmann *et al.*, 2000; Mizuguchi e Takashima, 2001). Portanto, sugere-se que esta deleção possa estar relacionada com a baixa atividade ATPásica nas linhagens de bexiga, já que é uma deleção comum neste tipo de tumor. Outra possibilidade que não pode ser excluída é a alteração na atividade enzimática por vias de regulação, embora este aspecto seja pouco explorado em relação as E-NTPDases, e muito pouco se sabe sobre como essas enzimas são reguladas.

Além disso, a elevada atividade de hidrólise do pirofosfato orgânico (PPi) no meio extracelular chamou a atenção para uma possível interferência na hidrólise dos demais nucleotídeos (Figura 2B). Para eliminar tal dúvida investigamos a presença da família das ecto-fosfodiesterases na linhagem de tumor de bexiga humana T24. Para tanto, incubamos o substrato específico 5'-TMP em dois valores de pH para eliminar a suspeita de interferência na hidrólise dos demais nucleotídeos, conforme já citado anteriormente nos resultados (Figuras 3A e 3B). Nossos resultados mostraram que apenas no pH 8,9, ou seja, no pH ótimo da enzima, observou-se uma atividade fosfodiesterásica. Por outro lado, em

pH7,5 (condição em que os demais nucleotídeos foram incubados) não foi observada hidrólise significativa do substrato 5'-TMP, indicando que esta enzima, embora presente nas células, não está ativa e portanto, não contribui para a hidrólise dos nucleotídeos di- e trifosfatados nas condições de ensaio. Efetivamente, a análise por RT-PCR confirmou a presença da E-NPP1 (Figura 4B) que está relacionada com a reciclagem de nucleotídeos.

Portanto, um importante achado do presente estudo é que, da família das E-NTPDases, observamos apenas a expressão da enzima E-NTPDase 5 (CD39L4), um proto-oncogene, e de um membro das E-NPPs, a NPP1 na linhagem de bexiga estudada.

#### **4.2 A EXPRESSÃO DA 5'-NUCLEOTIDASE NO TUMOR DE BEXIGA**

Em determinadas condições patofisiológicas, como no câncer, parece haver uma regulação coordenada das enzimas que metabolizam a adenosina: a ecto-5'-NT/CD73 e a ecto-ADA, resultando em um aumento na expressão da ecto-5'-NT/CD73 e uma concomitante diminuição na expressão da ecto-ADA. Tal mudança poderia favorecer o aumento dos níveis extracelulares de adenosina, desencadeando ações que incluem efeitos promotores tumorais e imunossupressores (Spsychala, 2000).

Em nosso estudo observamos uma elevada hidrólise AMPásica (Figura 2A), dado confirmado pela expressão do RNAm da ecto-5'-NT/CD73 nas células T24 de tumor de bexiga humano, avaliado pelo método de RT-PCR (Figura 4C).

Sabe-se que o produto da reação catalisada pela ecto-5'-NT/CD73, adenosina, é um dos fatores que potencialmente pode contribuir para o crescimento tumoral. Estudos demonstram que a adenosina acumula em elevadas concentrações em tumores sólidos, podendo estimular o crescimento tumoral, angiogênese e inibição da síntese de citocinas e

da adesão de células do sistema imune (Spychala, 2000). Muito recentemente, foi demonstrada a caracterização molecular e farmacológica de subtipos de receptores da adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ ) nas mesma linhagem T24 utilizada no presente estudo (Phelps *et al.*, 2006). Os dados deste estudo apresentam informações envolvendo o mecanismo associado com a sinalização transmembrana e o papel da adenosina na bexiga.

Por outro lado, o AMP, molécula precursora da adenosina, demonstrou exercer efeito antiproliferativo em linhagem de tumor de mama (MCF-7), estando essa ação vinculada à inibição da glicólise (Hugo *et al.*, 1992). Recentemente, foi caracterizado um receptor purinérgico para a ligação do AMP, denominado  $P2Y_{15}$ , o qual pode ser o responsável pelas ações, até agora pouco conhecidas, do AMP extracelular (Inbe *et al.*, 2004), sendo que este receptor também foi detectado pelo método de RT-PCR na linhagem T24 (Figura 5). A elevada atividade de ecto-5'-NT/CD73 também pode estar associada com resistência a drogas antitumorais, onde a alta atividade enzimática está relacionada com a síntese *de novo* do ATP, molécula energética necessária para o bombeamento da droga para o meio extracelular (Ujházy *et al.*, 1996).

Concluindo, a avaliação da hidrólise enzimática do AMP demonstrou um aumento na atividade da enzima 5'-NT que pode estar relacionada com o crescimento tumoral na bexiga.

### **4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 EM LINHAGEM DE TUMOR DE BEXIGA HUMANO**

Nucleotídeos e nucleosídeos derivados da adenina podem ser liberados por diversos tipos celulares em condições patofisiológicas, modulando uma variedade de efeitos

(Schwiebert e Zsembery, 2003). A liberação desses nucleotídeos/nucleosídeos para o meio extracelular pode estimular os receptores purinérgicos de uma forma parácrina e autócrina, podendo ativar cascatas de sinalização responsáveis por uma variedade de ações relacionadas à proliferação, invasão e morte do tecido normal adjacente ao tumor (Insel *et al.*, 2001).

Em estudos recentes em nosso laboratório mostramos que o ATP e a adenosina extracelulares induzem estímulo proliferativo em diferentes linhagens de gliomas (Morrone *et al.*, 2003). Posteriormente, foi demonstrado que o ATP é degradado muito lentamente por gliomas quando comparado com astrócitos, o que pode resultar no acúmulo deste nucleotídeo extracelular ao redor do glioma (Wink *et al.*, 2003b).

Como já descrito, sabe-se que o ATP age através de receptores purinérgicos P2X e P2Y. Na bexiga, os receptores P2X<sub>1</sub> agem no músculo detrusor, enquanto que os receptores P2X<sub>3</sub> têm papel sensorial. Burnstock em 1999 propôs o conceito de sinalização mecanosensorial, sugerindo que a distensão de tubos, incluindo ureter, vagina, ductos salivares e intestino, e sacos, incluindo bexiga urinária e pulmão, levam à liberação de ATP a partir do epitélio, agindo nos receptores P2X<sub>3</sub> nos nervos sensoriais subepiteliais e convertendo informação ao SNC. Muitos estudos vêm sendo realizados nesta área, Ferguson e colaboradores em 1997, sugeriram que o ATP poderia estar envolvido na sinalização aferente da bexiga urinária, mostrando que o ATP era liberado a partir do urotélio de coelhos em resposta ao estiramento.

Os receptores P2Y podem formar estruturas homo- ou hetero- multiméricas sob diversas condições. Alguns receptores P2Y são ativados principalmente por nucleotídeos difosfatados (P2Y<sub>1,6,12,13</sub>), enquanto que outros são ativados principalmente por nucleotídeos trifosfatados (P2Y<sub>2,4</sub>).



Considerando a participação dos receptores P2Y na proliferação celular, nos pareceu muito importante investigar a expressão dos receptores purinérgicos em linhagem de tumor de bexiga. Todos os receptores P2Y que foram analisados pelo método de RT-PCR na linhagem T24, apresentaram expressão, inclusive os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> (Figura 5). Segundo White e Burnstock (2006) os nucleotídeos extracelulares, purinas e pirimidinas podem regular proliferação, diferenciação e apoptose de células tumorais através de diferentes subtipos de receptores. A ativação do receptor P2Y<sub>2</sub> pode levar ao aumento do número de células em diferentes tipos de câncer, enquanto que a ativação do receptor P2Y<sub>1</sub> leva à diminuição do número de células (White e Burnstock, 2006). Isso indica que diferentes subtipos de receptores podem estar presentes na mesma célula e que a variação destes receptores pode resultar em efeitos opostos quanto à proliferação celular.

Portanto, o conjunto de resultados aqui discutidos nos leva a pensar que o sistema purinérgico pode estar efetivamente envolvido no crescimento de tumores de bexiga. Estudos estão sendo realizados para identificar a expressão dos receptores P2X neste tipo tumoral.

#### **4.4 EFEITO DO ATP EXTRACELULAR NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS T24**

Abraham e colaboradores (2003) relatam o ATP como um possível agente no tratamento de câncer, mostrando que o ATP extracelular inibe o crescimento de vários tipos de tumores incluindo próstata, mama, cólon, ovário, fígado e melanoma, em parte causando a morte das células tumorais por via apoptótica. No estudo acima citado, também foi mostrado que a administração de ATP induz resistência à quimioterapia e a radioterapia em tecidos não malignos, sugerindo o uso do ATP como uma possível droga antitumoral.

Por outro lado, estudos recentes em nosso laboratório demonstraram que, ao contrário do tecido cerebral normal, gliomas apresentam uma clara resistência à morte induzida por concentrações citotóxicas de ATP (Morrone *et al.*, 2005). Assim, o fato do ATP ser pouco metabolizado pelo glioma, enquanto que o AMP é rapidamente convertido a adenosina, poderia propiciar o acúmulo dessas moléculas sinalizadoras na superfície tumoral, resultando em estímulo proliferativo para as células cancerígenas e citotoxicidade para o tecido normal.

A partir dos dados citados acima, decidimos investigar a função do ATP extracelular na proliferação e morte do tumor de bexiga. Não foi possível estabelecer o crescimento das linhagens em condições de cultura com redução de soro, condição fundamental para estudar o potencial efeito proliferativo do ATP. Desta forma, no presente estudo, não conseguimos investigar o potencial efeito proliferativo do ATP em concentrações fisiológicas ( $< 100 \mu\text{M}$ ). Por outro lado, resultados preliminares indicaram uma diminuição no crescimento das células tumorais quando estas são tratadas com elevadas concentrações de ATP por diferentes períodos (24 e 48 horas), mostrando que o ATP possui efeito citotóxico sobre essas células (Figura 6). Ainda não sabemos exatamente como o ATP exerce esse efeito, ou seja, quais receptores e/ou quais vias estão sendo ativadas para gerar essa morte celular. Outros ensaios serão realizados para estabelecer as condições experimentais que nos permitam avaliar o possível efeito e mecanismos envolvidos do ATP sobre as linhagens de tumor de bexiga.

Portanto, outro achado importante do presente estudo é a morte celular induzida por altas concentrações de ATP extracelular observada em cultura de células de bexiga. Tais

achados tornam o sistema purinérgico um possível alvo de desenvolvimento de terapias anti-tumorais.

## ***CONCLUSÕES***

Esta dissertação representa o primeiro estudo das propriedades bioquímicas do sistema purinérgico em cultura de células de tumor de bexiga. Através de nossos estudos podemos chegar as seguintes conclusões:

- A expressão das ectonucleotidases na linhagem estudada mostrou a presença da enzima E-NTPDase 5 (CD39L4), um proto-oncogene, e da NPP1.
- A avaliação da hidrólise enzimática do AMP demonstrou uma expressiva atividade da enzima 5'-NT e sua expressão nestas células.
- A avaliação da expressão dos receptores purinérgicos permitiu a identificação de todos os receptores purinérgicos do tipo P2Y nas células estudadas.
- Foi observada uma diminuição do crescimento das células tumorais tratadas com elevadas concentrações de ATP extracelular .

## *PERSPECTIVAS*

Este trabalho deixa algumas perspectivas para a continuação dos estudos relacionados aos tumores de bexiga, já que pouco se sabe sobre a relação do sistema purinérgico e essa patologia.

- Investigar a expressão dos receptores purinérgicos do tipo P2X;
- Investigar quais as possíveis vias de ação do ATP extracelular sobre a morte celular;
- Avaliar os efeitos do ATP extracelular em baixas concentrações sobre a proliferação celular;
- Identificar as ecto-nucleotidasas e os receptores purinérgicos em células normais a fim de se estabelecer um estudo comparativo.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABBRACCHIO M. P., SAFFREY M. J., PÓQUER V., BURNSTOCK G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum; *Neuroscience* 59: 67-76; 1994.
- AIRAS L., HELLMAN J., SALMI M., BONO P., PUURUNEN T., SMITH D. J., LKANEN S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73; *J.Exp. Med.* 182: 1603-1608; 1995.
- ABRAHAM EH, SALIKHOVA AY, RAPAPORT E; ATP in the treatment of advanced cancer; *Curr. Top. Membr.* 54: 415-452; 2003.
- ASHFAQUE A MEMON MBBS, JONG W CHANG, BONG R OH, YUNG J YOO; Identification of differentially expressed proteins during human urinary bladder cancer progression; *Cancer Detection and Prevention* 29: 249-255; 2005.
- BARDOT V, DUTRILLAUX AM, DELATTRE JY, VEJA F, POISSON M, DUTRILLAUX B, LUCCIONI C; Purine and pyrimidine metabolism in human gliomas: relation to chromosomal aberrations; *Br Journal Cancer* 70: 212-218; 1994.
- BIEDERBICK A, ROSE S, ELSASSER HP; A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles; *Journal Cell Science* 112: 2473-2484; 1999.
- BIGONNESSE F, LÉVESQUE SA, KUKULSKI F, LECKA J, ROBSON SC, FERNANDES MJG, SÉVIGNY J; Cloning and Characterization of Mouse Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-8; *Biochemistry* 43:5511-5519; 2004.

- BOLLEN M, GIJSBERS R, CEULEMANS H, STALMANS W, STEFAN C; Nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterases on the move; *Crit Ver Biochem Mol Biol* 35: 393-432; 2000.
- BURNSTOCK G; Purine-mediated signalling in pain and visceral perception; *Trends Pharmacology* 22: 182-188; 2001.
- BURNSTOCK G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem.* 4, 793-803, 2004.
- BURNSTOCK G; Introduction: P2 receptors; *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4: 793-803; 2004.
- BURNSTOCK G; Purinergic signalling; *British Journal of Pharmacology* 147: s172-s181; 2006.
- CANBOLAT O, DURAK I, CETIN R, KAVUTCU M, DEMIRCI S, OZTURK S; Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues; *Breast Cancer Research Treat.*; 37(2): 189-93; 1996.
- CHADWICK B. P., FRISCHAUF A. M. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes; *Mammalian Genome* 8: 668-672; 1997.
- COOKE HJ, WUNDERLICH J, CHRISTOFI FI; "The force be with you": ATP in gut mechanosensory transduction; *Neuroscience Physiology Sci* 18: 43-49; 2003.
- COUTINHO-SILVA R, STAHL L, CHEUNG KK, DE CAMPOS NE, DE OLIVEIRA SOUZA C, OJCIUS DM, BURNSTOCK G; P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G1024-35; 2005.

- DASMAHAPATRA KS, HILL HZ, DASMAHAPATRA A, SUAREZ S; Evaluation of adenosine deaminase activity in patients with head and neck cancer; *Journal Surg Research* 40: 368-373; 1986.
- DOMBROWSKI KE, TREVILLYAN IM, CONE IC, LUY, PHILLIPS CA; Identification and partial characterization of na ecto ATPase expressed by human natural killer cells; *Biochemistry*, 32: 6515-6522; 1993.
- DOZMOROV MG, KIMBERLY DK, SABAN R, KNOWLTON N, DOZMOROV I, CENTOLA MB, HURST RE; Analysis of the interaction of extracellular matrix and phenotype of bladder cancer cells; *BMC Cancer* 1-12; 2006.
- DURAK I., ISIK A.C. CANBOLAT O., AKYOL O., KAVUTCU M. Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues. *Free Radic Biol Med.* 16, 825-31, 1994.
- DZHANDZHUGAZYAN KN, KIRKIN AF, STRATEN PT, ZEUTHEN J; Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas; *FEBS Letters* 430: 227-230; 1998.
- FASTBOM L., PAZOS A., PALACIOS J.M. The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals; *Neurosci.* 22(3): 813-26; 1987.
- FENOGLIO C, NECCHI D, CIVALLERO M, CERONI M, NANO R; Cytochemical demonstration of nitric oxide synthase and 5' nucleotidase in human glioblastoma; *Anticancer Research* 4A: 2507-2511; 1997.
- FLOCKE K, MANNHERZ HG; Isolation and characterization of 5'-nucleotidase of a human pancreatic tumor cell line; *Biochemical Biophysical Acta* 1076: 273-281; 1991.



- FRANCO R., CASADÓ V., CIRUELA F., SAURA C., MOLLOL J., CANELA E. ILLUIS C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme; *Prog. Neurobiol.* 52: 283-294; 1997.
- FREDHOLM BB, ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G, DUBYAK GR, HARDEN TK JACOBSON KA, SCHWABE U, WILLIAMS M; Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors; *Trends Pharmacology Science* 18: 79-82; 1997.
- GODING JW, GROBBEN B, SLEGGERS H; Physiological and pathophysiological functions of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family; *Biochimica et Biophysica Acta* 1638: 1-19; 2003.
- GRINTHAL A, GUIDOTTI G; Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras; *Biochemistry* 41: 1947-56; 2002.
- GUTMANN D. H., ZHANG Y., HASBANI M. J., GOLDBERG M. P. PLANK T. L., HENSKE E. P. Expression of the tuberous sclerosis complex gene products, hamartin and tuberin, in central nervous system tissues; *Acta Neurophatol.* 99: 223-230; 2000.
- HEINE P, BRAUN N, HEILBRONN A, ZIMMERMANN H; Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells; *European Journal Biochemistry* 262: 102-107; 1999.
- HUGO F., MAZUREK S., ZANDER U., EIGENBRODT E. In vitro effect of extracellular AMP on MCF-7 breast cancer cells: inhibition of glycolysis and cell proliferation; *J Cell Physiol.* 153(3): 539-49; 1992.

- INBE H., WATANABE S., MIYAWAKI M., TANABE E., ENCINAS J.A. Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y<sub>15</sub>, for AMP and adenosine; *JBC* 279 (19): 19790-9; 2004.
- INSEL P.A., OSTROM R.S., ZAMBON A.C., HUGHES R.J., BALBOA M.A., SHEHNAZ D., GREGORIAN C., TORRES B., FIRESTEIN B.L., XING M., POST S.R. P2Y receptors of MDCK cells: epithelial cell regulation by extracellular nucleotides; *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28: 351-4; 2001.
- KITTEL A, GARRIDO M, VARGAS G; Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas; *J. Histochem. Cytochem.* 50: 549-555; 2002.
- KNOWLES MA., HABUCHI T, KENNEDY W, CUTHBERT-HEAVENS D; Mutation Spectrum of the 9q34 Tuberous Sclerosis Gene TSC1 in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder; *Cancer Research* 63: 7652-7656; 2003.
- LAMM DL AND TORTI FM; Bladder Cancer, 1996; *CA- A cancer Journal For Clinicians* 46: 93-112; 1996.
- LAVOIE EG, KUKULSKI F, LÉVESQUE SA, LECKA J, SÉVIGNY J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3; *Biochem Pharmacol* 67: 1917 – 1926; 2004.
- LEMMENS R, VANDUFFEL L, TEUCHY H, CULIC O; Regulation of proliferation of LLC-MK2 cells by nucleosides and nucleotides: the role of ecto-enzymes; *Biochemical Journal* 316: 551-557; 1996.
- LAWS JR E. R., SHAFFREY M. E. The inherent invasiveness of cerebral Gliomas: implications for clinical management; *Int. J. Neurosci.* 17: 413-20; 1999.

LUDWIG H.C., RAUCH S., SCHLLOCK K., MARKAKIS E. Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry; *Anticancer Res* 19(3A): 1747-52; 1999.

MATEO J, HARDEN TK, BOYER JL; Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase; *Br Journal Pharmacology* 128: 396-402; 1999.

MIZUGUCHI M., TAKASHIMA S; Neuropathology of tuberous sclerosis; *Brain Dev.*23: 508-515; 2001.

MORRONE FB, JACQUES-SILVA MARIA C., HORN AP, BERNARDI A., SCHWARTSMANN G, RODNIGHT R, LENZ, G; Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell line. *J Neuro-oncology* 64, 211-18, 2003.

MORRONE FB, HORN AP, STELLA J, SPILLER F, SARKIS JJF, SALBEGO C., LENZ G, BATTASTINI AMO; Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neuro-oncology* 71, 135-140, 2005.

MORRONE FB, OLIVEIRA DL, GAMERMANN PW, STELLA J, WOFCHUK S, WINK MR, MEURER L, EDELWEISS MIA, LENZ G, BATTASTINI AMO; Involvement of extracellular ATP on the glioblastoma growth in a rat glioma model; paper in submitting; 2006.

MULERO J. J., YEUNG G., NELKEN S. T., BRIGHT J. M., MCGOWAN D. W., FORD J. E; Biochemical characterization of CD39L4; *Biochemistry* 39: 12924-12928; 2000.

MURPHY-PIEDMONTE DM, CRAWFORD PA, KIRLEY TL; Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase 5 (CD39L4) ecto-nucleotidase; *Biochimica et Biophysica Acta* 1747: 251-259; 2005.

NOTARIO V, ROUZAUT A, RECIO JA; Expression of the Protein Product of the PCPH Proto-oncogen in Human Tumor Cell Lines; Radiation Research 155: 181-187; 2001.

NOVAK I; ATP as a signaling molecule: the exocrine focus; News Physiological 18: 12-17; 2003.

PAEZ JG, RECIO JÁ, ROUZAUT A, NOTARIO V; Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4 (ENTPDase5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene; Int Journal Oncology 19: 1249-1254; 2001.

PHELPS PT, ANTHES JC, CORRELL CC; Characterization of adenosine receptors in the human bladder carcinoma T24 cell line; European Journal of Pharmacology 536: 28-37; 2006.

PIAZZA GA, THOMPSON WJ, PAMUKEU R, ALILA HW, WHITEHEAD CM, LIU L, FETTER JR, WILLIAN EG, KLEIN-SZANTO AJ, FARNELL DR, ETO I, GRUBBS CJ; Exisulind, a Novel proapoptotic Drug, Inhibits Rat Urinary Bladder Tumorigenesis; Cancer Research 61: 3961-3968; 2001.

PLESNER L; Ecto-ATPases: identities and functions; Int. Rev. Cytol. 158: 141-214; 1995.

PRAGER MD, KANAR MC; Effect of dimethylsulfoxide and butyrate on 5'-nucleotidase of human renal carcinoma cells; Cancer Letters 24: 81-89; 1984.

PRZYSBYLO M, HOJA-LUKOWICZ D, LITYNSKA A, LAIDLER P; Different glycosylation of cadherins from human bladder non-malignant and cancer cell lines; Cancer cell International 1-5; 2002.

PRZYBYLO M, LITYNSKA A, POCHEC E; Different adhesion and migration properties of human HCV29 non-malignant urothelial and T24 bladder cancer cell: role of glycosylation; Biochimie 87: 133-142; 2005.

- RAPP DE, LYON MB, BALES GT, COOK SP; A role for the P2X receptor in urinary tract physiology and in the pathophysiology of urinary dysfunction; *Europe urology* 48: 303-308; 2005.
- RALEVIC V, BURNSTOCK G; Receptors for purines and pyrimidines; *Pharmacology Revue* 50: 413-492; 1998.
- RECIO JA, GUILLERMO PJ, SANDERS S, KAWAKAMI T, VICNOTARIO V; Partial Depletion of Intracellular ATP Mediates the Stress-Survival Function of the PCPH ncoprotein; *Cancer Research* 62: 2690-2694; 2002.
- SALA-NEWBY GB, SKLADANOWSKI AC, NEWBY AC; The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5' nucleotidase-I; *The Journal of Biological Chemistry* 274: 17789-17793; 1999.
- SCHOEN SW, GRAEBER MB, TÓTH L, KREUTZBERG GW; 5'- Nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for migrating nerve cells? *Dev. Brain Res.* 39: 125-136; 1988.
- SCHWIEBERT E. M. AND ZSEMBERY A; Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells; *Biochim.Biophys.Acta* 1615 ; 7-32; 2003.
- SLEGTENHORST M. V., HOOGT R., HERMANS C. et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34; *Science* 277: 805-808; 1997.
- SPYCHALA J. Tumor-promoting functions of adenosine; *Pharmacol. Ther.* 87: 161-73; 2000.
- STEFAN C, JANSEN S, BOLLEN M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity; *Trends Biochem Sci* 30: 542-550; 2005.

TEMPEST HV, DIXON AK, TURNER WH, ELNEIL S, SELLERS LA, FERGUSON DR;

P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptor expression in human bladder urothelium and changes in interstitial cystitis; *BJU Int* 93: 1344-1348; 2004.

THOMPSON LF, RUEDI JM, O'CONNOR RD, BASTIAN JF; Ecto-5'-nucleotidase

expression during human B cell development. An explanation for the heterogeneity in B lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in patients with hypogammaglobulinemia; *Journal Immunology* 137: 2496-500; 1986.

THOMPSON LF, RUEDI JM, GLASS A, LOW MG, LUCAS AH; Antibodies to 5'-

nucleotidase (CD73), a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, cause human peripheral blood T cells to proliferate; *Journal Immunology* 143: 1815-1821; 1989.

THORN JA AND JARVIS SM; Adenosine transporters; *Gen. Pharmacology* 27: 613-620;

1996.

UJHÁZY P., BERLETH E.S., PIETKIEWICZ J.M., KITANO H., SKAAR J.R., EHRKE

M.J., MIHICH E. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance; *Int J Cancer* 68: 493-500; 1996.

WALLACE DM; Occupational urothelial cancer; *Br Journal Urology* 61: 175-182; 1988.

WANG TF, GUIDOTTI G; Golgi localization and functional expression of human uridine

diphosphatase; *Journal Biochemical Chemistry* 273: 11392-11399; 1998.

WANG L., MATSUSHITA K., ARAKI L., TAKEDA M. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase ameliorates apoptosis induced by hydrogen peroxide in the kidney tubule epithelial cells (NRK-52E); *Nephron*. 91: 142-47; 2002.

WHITE N, BUTLER P, BURNSTOCK G; Human melanomas express functional P2X<sub>7</sub> receptors; *Cell Tissue Research* 321: 411-418; 2005.

- WINK M.R., BRAGANHOL E., TAMAJUSUKU A.S.K., CASALI E.A., KARL J., BARRETO-CHAVES M.L., SCHWARTSMANN G., SARKIS J.J.F., BATTASTINI A.M.O. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions; *Neurochem International* 43: 621-28; 2003a.
- WINK M.R., LENZ G., BRAGANHOL E., TAMAJUSUKU A.S.K., SCHWARTSMANN G., SARKIS, J.J.F., BATTASTINI A.M.O; Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines; *Cancer Lett.* 198: 211-18; 2003b.
- WINK MR, BRAGANHOL E, TAMAJUSUKU ASK, LENZ G, ZERBINI,LF, LIBERMANN TA, SÉVIGNY CJ, BATTASTINI AMO, ROBSON SC; Nucleotide Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the Dominant Ectonucleotidase Expressed by Rat Astrocytes; *Neuroscience* 138: 421-432; 2006.
- WHITE N, BURNSTOCK G; P2 receptors and cancer; *Trends in Pharmacological Sciences* 27: 211-217; 2006.
- ZEEGERS MPA, SWAEN GMH, KANT I, GOLDBOHM RA, VAN DEN BRANDT PA; Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands; *Occupational Environ Med* 58: 590-596; 2001.
- ZIMMERMANN H. 5'- Nucleotidase: molecular structure and functional aspects; *Biochem. J.* 285: 345- 65; 1992.
- ZIMMERMANN H; Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system; *Prog. Neurobiol.* 49: 589-618; 1996.
- ZIMMERMANN H; Two novel families of ecto-nucleotidases: molecular structures catalytic properties, and a search for function; *Trends Pharm. Sci.* 20: 231-236; 1999.
- ZIMMERMANN H; Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature; *Drug Dev. Res.* 52: 44-56; 2001.